

**SCIENTIFIC PUBLICATIONS
BY
WALTER KEMPNER, MD**

Volume I

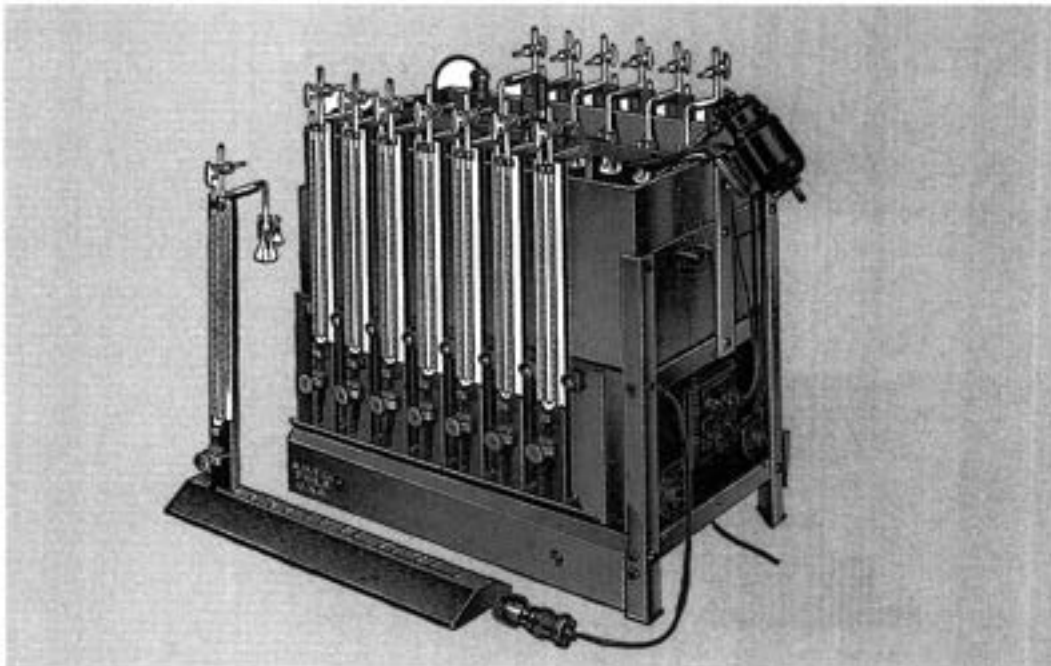
Studies in Cellular Physiology

**SCIENTIFIC PUBLICATIONS
BY
WALTER KEMPNER, MD**

Volume I



Kaiser-Wilhelm Institute for Cellular Physiology, Berlin, Germany.



Warburg apparatus for the study of chemical reactions of cells, bacteria, and tissue specimens.

**SCIENTIFIC PUBLICATIONS
BY
WALTER KEMPNER, MD**

Volume I

Studies in Cellular Physiology

**Edited with a Foreword by
Barbara Newborg, MD**

Gravity Press
Durham, North Carolina
2002

Copyright © 2002 by Gravity Press

ISBN 0-9654797-1-4

Walter Kempner, "Effect of Oxygen Tension on Cellular Metabolism," copyright © 1937 *Journal of Cellular and Comparative Physiology*. Reprinted by permission of the Wistar Institute. Walter Kempner, "Chemical Nature of the Oxygen-Transferring Ferment of Respiration in Plants," copyright © 1936 *Plant Physiology*. Reprinted by permission of the American Society of Plant Biologists. Clotilde Schlager, "The Influence of Oxygen Tension on the Respiration of Pneumococci (Type 1)," copyright © 1936 *Journal of Bacteriology*. Reprinted by permission of the American Society for Microbiology. Walter Kempner, "Inhibitory Effect of Low Oxygen Tension on the Deamination of Amino Acids," copyright © 1938 *Journal of Biological Chemistry*. Reprinted by permission of the American Society for Biochemistry and Molecular Biology.

The following articles appeared in *The American Journal of Physiology* and are reprinted by permission of the American Physiological Society: "Walter Kempner, Anoxemia of the Kidney As a Cause of Uremic Acidosis," copyright © 1938. Walter Kempner, "The Effects of the Variations of Atmospheric Oxygen Concentration upon the Metabolism of Tubercle Bacteria," copyright © 1939. Walter Kempner, "Metabolism of Human Myeloblasts and Its Sensitivity Toward Variations of Oxygen Tension," copyright © 1939.

The following articles appeared in various publications as noted and are reprinted by permission of Springer-Verlag & Co.: Walter Kempner, "Atmung im Plasma pestkranker Hühner," copyright © 1927 *Klinische Wochenschrift*. Walter Kempner and Ernst Peschel, "Stoffwechsel der Entzündung," copyright © 1930 *Zeitschrift für klinische Medizin*. Ernst Peschel, "Stoffwechsel leukaemischer Lymphocyten," copyright © 1930 *Klinische Wochenschrift*. Ruth Lohmann, "Krebsstoffwechsel und Entzündung," copyright © 1931 *Klinische Wochenschrift*. Walter Kempner, "Wirkung von Blausäure und Kohlenoxyd auf die Buttersäuregärung," copyright © 1933 *Biochemische Zeitschrift*. Walter Kempner and Fritz Kubowitz, "Wirkung des Lichtes auf die Kohlenoxdhemmung der Buttersäuregärung," copyright © 1933 *Biochemische Zeitschrift*. Ruth Lohmann, "Manometrische Untersuchungen über Stoffwechsel und Wachstum von Bakterien unter dem Einfluss von ultraviolettem Licht und unter den Bedingungen der Entzündung," copyright © 1934 *Klinische Wochenschrift*. Clotilde Schlager, "Wirkung des Kohlenoxyds auf die Gärung von Tetanus- und Gasbrandbazillen," copyright © 1935 *Biochemische Zeitschrift*. Ruth Lohmann, "Gasstoffwechsel und Glykogenzerfall," copyright © 1937 *Klinische Wochenschrift*. Walter Kempner, "Verminderter Sauerstoffdruck in der Niere als Ursache der 'reversiblen' urämischen Acidose," copyright © 1938 *Klinische Wochenschrift*. Ruth Lohmann, "Biologie der Entzündung," copyright © 1938 *Zeitschrift für klinische Medizin*. Ruth Lohmann, "Zur Wirkung des Insulins auf die Zuckerverwertung im Glykogenzerfall," copyright © 1938 *Zeitschrift für klinische Medizin*. Clotilde Schlager, "Manometrische Bestimmung von Aminosäuren mit Ninhydrin im Warburg-Apparat," copyright © 1938 *Biochemische Zeitschrift*. Clotilde Schlager, "Sauerstoffzehrung des Urins und Sauerstoffdruck der Niere," copyright © 1939 *Klinische Wochenschrift*.

Gravity Press
PO Box 2739
Durham, NC 27715

Printed in Canada

VOLUME I

Studies in Cellular Physiology

Table of Contents

| | |
|---|----------|
| Foreword | 1 |
| 1927 | |
| Kempner, Walter. <i>Zur Kenntnis des Phlorhizindiabetes</i> [The nature of phlorhizin diabetes] | 3 |
| Kempner, Walter. <i>Atmung im Plasma pestkranker Hühner</i> [Respiration in the plasma of chickens with plague] | 29 |
| 1930 | |
| Kempner, Walter and Peschel, Ernst. <i>Stoffwechsel der Entzündung</i> [Metabolism of inflammation] | 33 |
| Peschel, Ernst. <i>Stoffwechsel leukämischer Lymphocyten</i> [Metabolism of leukemic lymphocytes] | 57 |
| 1931 | |
| Lohmann, Ruth. <i>Krebsstoffwechsel und Entzündung</i> [Cancer metabolism and inflammation] | 63 |
| 1933 | |
| Kempner, Walter. <i>Wirkung von Blausäure und Kohlenoxyd auf die Buttersäuregärung</i> [Effect of cyanide and carbon monoxide on butyric acid fermentation] | 79 |
| Kempner, Walter and Kubowitz, Fritz. <i>Wirkung des Lichtes auf die Kohlenoxydhemmung der Buttersäuregärung</i> [Effect of light on the inhibition of butyric acid fermentation by carbon monoxide] | 103 |

1934

- Lohmann, Ruth.** *Manometrische Untersuchungen über Stoffwechsel und Wachstum von Bakterien unter dem Einfluss von ultraviolettem Licht und unter den Bedingungen der Entzündung* [Manometric studies to determine the effects of ultraviolet light and conditions of inflammation on the metabolism and growth of bacteria] 117

1935

- Schlayer, Clotilde.** *Wirkung des Kohlenoxyds auf die Gärung von Tetanus- und Gasbrandbazillen* [Effect of carbon monoxide on fermentation of tetanus and *Clostridium welchii* bacteria] 133

1936

- Kempner, Walter.** *The metabolism of human erythroblasts* 141
- Kempner, Walter.** *Chemical nature of the oxygen-transferring ferment of respiration in plants* 149
- Kempner, Walter.** *Effect of low oxygen tension upon respiration and fermentation of isolated cells* 161
- Schlayer, Clotilde.** *The influence of oxygen tension on the respiration of pneumococci (Type I)* 169
- Lohmann, Ruth.** *Über das Verhalten des Fermentes der Milchsäuregärung beim Glykogenzerfall* [On the reaction of the enzyme of lactic acid fermentation during pathologic glycogen breakdown] 183

1937

- Schlayer, Clotilde.** *Der Einfluss des Sauerstoffdrucks auf den Zellstoffwechsel und der Mechanismus der Blausäurewirkung* [Influence of oxygen tension on cell metabolism and the mechanism of the cyanide effect] 189
- Kempner, Walter.** *Effect of oxygen tension on cellular metabolism* 197
- Lohmann, Ruth.** *Gasstoffwechsel und Glykogenzerfall* [Metabolism of gases and pathologic glycogen breakdown] 227

1938

- Kempner, Walter.** *Verminderter Sauerstoffdruck in der Niere als Ursache der "reversiblen" urämischen Acidose* [Anoxemia of the kidney as a cause of reversible uremic acidosis] 235
- Kempner, Walter.** *Anoxemia of the kidney as a cause of uremic acidosis* 245
- Kempner, Walter.** *Inhibitory effect of low oxygen tension on the deamination of amino acids in the kidney* 249
- Lohmann, Ruth.** *Biologie der Entzündung* [Biology of inflammation] 261
- Lohmann, Ruth.** *Zur Wirkung des Insulins auf die Zuckerverwertung im Glykogenzerfall* [The effect of insulin on sugar utilization during pathologic glycogen breakdown] 297
- Schlayer, Clotilde.** *Manometrische Bestimmung von Aminosäuren mit Ninhydrin im Warburg-Apparat* [Manometric assay of amino acids with ninhydrin in the Warburg apparatus] 303

1939

- Kempner, Walter.** *The effect of variations of atmospheric oxygen concentration upon the metabolism of tubercle bacteria* 309
- Kempner, Walter.** *Oxygen tension and the tubercle bacillus* 313
- Walter Kempner.** *The role of oxygen tension in biological oxidations* 329
- Kempner, Walter and Gaffron, Mercedes.** *The metabolism of human myeloblasts and its sensitivity toward variations of oxygen tension* 355
- Kempner, Walter.** *The nature of leukemic blood cells as determined by their metabolism* 361
- Schlayer, Clotilde.** *Sauerstoffzehrung des Urins und Sauerstoffdruck der Niere* [Oxygen consumption in urine and oxygen tension in the kidney] 375

1941

- Hanes, Frederic M. and Kempner, Walter.** *The effect of various sulfonamide drugs on pneumococcus, as determined by measuring manometrically the bacterial metabolism* 383

Acknowledgements

The impetus to gather Dr. Kempner's scientific work in one publication was provided by Dr. Eugene A. Stead, Jr., Professor Emeritus, Duke University Department of Medicine. Encouragement and help at all stages was offered by Judith Binder, Joan Mertens, Katharina Mommsen, Fides Ruestow, Hanna Ruestow, and Clotilde Schlayer. Thanks are due to Dr. Francis Neelon, Associate Professor, Duke University Department of Medicine, for his sound suggestions and assistance, and to Ms. Florence Nash, Managing Editor, the *North Carolina Medical Journal*, for expert and meticulous editing. Dr. Sabine Dmoch-Ames provided invaluable assistance in assuring the accuracy of summaries and translations from the German. Doris Marriott was indefatigable in helping to assemble the text and original photographic materials. Design and production were superbly managed by Megan Arney and Juliette Montauk.

Note to the reader

The papers reprinted in this collection retain their size and pagination as originally published. The page numbers of this volume appear in the upper outer corners above the running headers.

Preceding the first page of the German text is an English summary. The only exception is the paper "Verminderter Sauerstoffdruck," page 235. That was published at the same time in English.

FOREWORD

This volume contains, in chronological order, all the scientific publications based on research by Dr. Walter Kempner between 1927 and 1941. The papers were written by Kempner alone, in conjunction with his associates, or by his associates under his close supervision and guidance. His early investigations on cellular physiology were made in Berlin in 1927-28 and 1933-34 at the Kaiser-Wilhelm Institute for Cellular Physiology (Director, Dr. Otto Warburg) and in 1928-33 at the Zweite Medizinische Klinik der Charité, a leading hospital in Berlin. After Kempner came to America in 1934, he continued these studies at Duke University Medical Center, in Durham, North Carolina.

During the first quarter of the 20th century Warburg, the father of cellular physiology, had developed apparatus and methods by which the reactions of living cells could be studied under various conditions and with various substrates. Kempner conducted his studies with normal cells in a physiological milieu. He found that oxygen tension played a significant role in cellular metabolism. Prior to his finding, it had been considered axiomatic that cell reactions were independent of oxygen concentration as long as any oxygen was present. This misleading conclusion resulted from experiments either with damaged cells in a physiological milieu or normal cells in a non-physiological environment.

Another facet of Kempner's work was to investigate inflammatory reactions. He established that, at the site of inflammation, there were, among other things, low oxygen tension, low blood sugar concentration, and an acid milieu. This fact was important because respiration and fermentation, two key biological reactions, require oxygen and sugar respectively. Low oxygen tension in the body occurs not only with inflammation but also from interference with the blood supply, swelling, etc. Kempner conducted studies on kidney cells, bacteria, etc., in which he varied oxygen tension and concentrations of sugar and bicarbonate.

Kempner's experiments with kidney tissues under conditions of low oxygen tension led to his epoch-making and far-reaching medical discovery: the use of a radical dietary treatment to compensate for renal metabolic dysfunction. This diet consists of about 95% carbohydrates, with the virtual elimination of sodium and fat, and a minimum of animal protein. It includes high potassium levels and low chloride. The so-called "rice diet" also brought about other dramatic and unanticipated results: decrease in heart size, compensation of heart and kidney failure, restoration of eyesight to blind patients, improvement in diabetic patients. The papers describing these results are presented in Volume II.

Zur Kenntnis des Phlorhizindiabetes
[The Nature of Phlorhizin Diabetes]

The Nature of Phlorhizin Diabetes

by Walter Kempner

The nature of phlorhizin diabetes is unknown. To investigate it, Kempner performed more than 250 blood sugar determinations on six rabbits and six dogs (one with Eck's fistula and one fasting dog receiving three phosphorus injections) after differing quantities and exposure times to phlorhizin. Animals receiving normal amounts of food (including the Eck fistula dog) had constant blood sugar levels, even with maximal glycosuria. In the fasting animals, glycosuria decreased but was still significant. Hypoglycemia was present in different intensities and after varying intervals following phlorhizin administration (lowest values were 16 and 19 mg/100cc in the Eck fistula dog). There were no signs of intoxication after phlorhizin. The same animals with the same blood sugar concentration after insulin had severe convulsions, suggesting that insulin intoxication is not conditioned only by the degree and length of hypoglycemia.

Hypoglycemia often begins only several hours after glycosuria and is never "regulated"; rather, it persists under phlorhizin administration until the next provision of food. Thus the drop in blood sugar content is not due to withdrawal of sugar through the kidneys, but rather to functional insufficiency of the liver harmed by fasting. With carbohydrate metabolism at equilibrium the liver can maintain blood sugar concentration, but under increasing stress it will fail.

In summary, phlorhizin causes not only kidney and excretory glycosuria but also a changed formation and utilization of sugar.

*Überreicht vom Verfasser**Nicht im Buchhandel*

Sonderabdruck aus

Archiv für experimentelle Pathologie und Pharmakologie. Bd. 122, Heft 1/2.

Verlag von F. C. W. Vogel in Leipzig, 1927.

Aus der Medizinischen Klinik Heidelberg.

73. Zur Kenntnis des Phlorhizindiabetes.

Von

Walter Kempner.

(Mit 8 Kurven.)

Das Wesen des Phlorhizindiabetes ist unbekannt. Man sah nach Darreichung des Glykosids in verschiedener Form und Menge Glykosurie wie beim echten Diabetes mellitus, aber unabhängig vom Blutzuckergehalt und von der Ernährung. Da ferner bei Schädigung und Ausschaltung der Leber die Zuckerausscheidung im Harn nicht gestört war, während bei Ausschaltung der Nieren keine Veränderung des Blutzuckers und der Organe des Kohlehydratstoffwechsels gefunden wurde, erschien eine spezifische Wirkung des Phlorhizins auf die Nieren wahrscheinlich (v. Mering, Minkowski¹).

Dafür sprach auch, daß bei Freilegung der Ureteren und Injektion verdünnter Phlorhizinlösung in die Nierenarterie der einen Seite im Ureterharn der injizierten Seite früher und reichlicher Zucker erschien als auf der anderen Seite (Zuntz).

Daß die Tubuli bei der Phlorhizinglykosurie wirksam sind, wurde durch Ausschaltung des Glomerulusapparats an der Froschniere gezeigt (Nussbaum), und anatomische Untersuchungen an Hunden und Kaninchen ergaben manchem Forscher eine Schädigung des Epithels der gewundenen Kanälchen (Trambusti und Nesti, v. Kossa, Policard und Garnier). Spezifische und degenerative Veränderungen des Kanälchenepithels wurden von Bickenbach²) nicht gefunden.

1) Verzeichnis der gesamten Phlorhizinliteratur bei Lusk, *Ergebn. d. Physiol.* 1912, Bd. 12.

2) Pflügers *Arch. f. d. ges. Physiol.* 1925, Bd. 208, Hft. 5/6.

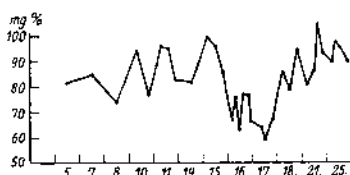
Archiv f. experiment. Path. u. Pharmakol. Bd. 122.

Aber auch in anderen sonst »zuckerfreien« Körperflüssigkeiten sind nach Phlorhizingabe reduzierende Substanzen nachgewiesen: in Galle (Levene¹⁾), Schweiß (Delmare²⁾), Pankreas-, Speichel- und Magensekret (Pearce³⁾), Ascites- und Pleurapunktaten (Hermann und Sachs⁴⁾): die Wirkung des Phlorhizins ist also nicht auf die Nierenzellen beschränkt. Die Theorie des »Nierendiabetes« durch Phlorhizin war im Sinne des »Ausscheidungsdiabetes« zu erweitern.

Wichtiger aber erschien die Frage nach Entstehungsort und -art der ausgeschiedenen Zuckermengen, und so war zunächst der Zuckergehalt des Blutes zu bestimmen: denn hätte man sich die Glykosurie als ein Übertreten des Blutzuckers in Harn oder Gewebe zu erklären bei veränderter Funktion nur der sezernierenden Zellen, so würde der Blutzuckergehalt der Stärke der Glykosurie entsprechend sinken. Diese hypoglykämische Zahl müßte sich an irgendeinem Punkt der Blutzuckerkurve ergeben, d. h. zu der Zeit, wo die im Harn ausgeschiedene Zuckermenge im Blute fehle, auch bei Voraussetzung einer sekundären Kompensation und Regulation durch die zuckerbildenden Organe.

Die Literaturangaben hierüber gehen auseinander: Es wurde normaler, vermehrter und verminderter Blutzuckergehalt nach Phlorhizin gefunden; doch waren fortlaufende Bestimmungen beim gleichen Individuum vor Einführung der Mikromethoden erschwert. Solche sind aber schon wegen der physiologischen Schwankungen des Blutzuckers notwendig.

Bekanntlich hat neben Abhängigkeiten von Ruhe oder Arbeit, Temperatur und psychischen Reizen bei gleichbleibender Versuchsanordnung



Kurve 1. Blutzuckerschwankungen am gleichmäßig ernährten Kaninchen zu verschiedenen Tageszeiten: 5. bis 25. VI. 1926.

den Haupteinfluß die Ernährung. So haben die meisten Autoren bei Phlorhizinuntersuchungen wie bei Prüfung anderer pharmakologischer

1) Journ. of exp. med. 1897, Bd. 2, S. 107.

2) Thèse de Paris 1899.

3) Americ. journ. of physiol. 1916, Bd. 40.

4) Wien. klin. Wochenschr. 1926, Bd. 39, S. 49.

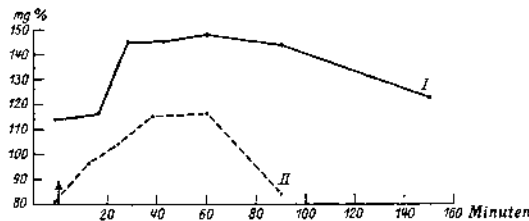
Zur Kenntnis des Phlorhizindiabetes.

3

Wirkungen auf den Blutzucker Hungertiere bevorzugt, um weniger schwankende Vergleichszahlen zu erhalten. Als physiologischer Normalzustand des Kohlehydratstoffwechsels oder der »Blutzuckerregulation« kann aber der Hunger nicht vorausgesetzt werden (s. S. 18). So schienen trotz der unregelmäßigeren Blutzuckerkurven Bestimmungen an »normal« ernährten Tieren notwendig.

Die häufigen Blutentnahmen und die vielleicht dadurch verminderte Freßlust der Tiere machen diesen »Normalzustand« allerdings auch wieder zweifelhaft und sind ebenso zu berücksichtigen wie Art und Menge der angewandten Injektionsflüssigkeiten.

Falls rasche Resorption beabsichtigt ist, wird das Phlorhizin gewöhnlich in schwacher Natriumkarbonatlösung injiziert, bei größerer Phlorhizindosis in stärkerer Konzentration von Na_2CO_3 , um eine zu große Flüssigkeitsmenge zu vermeiden; bei länger dauernder Phlorhiziniierung: in öligem Suspension. Geringe Mengen von Natriumkarbonatlösung und Oleum oliv. scheinen den Blutzuckergehalt nicht zu verändern. Bei subkutaner Injektion größerer Mengen entsteht beim Kaninchen Hyperglykämie, vielleicht auch in Abhängigkeit von der Konzentration der Lösung. Aber schon aqua dest. bewirkt in größeren Mengen (40 ccm) eine Hyperglykämie von über 40%. 0,9%ige Kochsalzlösung in der gleichen Menge steigert den Blutzuckergehalt nicht.



Kurve 2. Subkutane Injektion von I. 35 ccm 1,5%ige Na_2CO_3 -Lösung beim normal ernährten Kaninchen. II. 40 ccm aqua dest. beim Hungerkaninchen (45 Stunden).

Blutzuckerzahlen zwischen 60 und 150 mg % wurden beim gleichmäßig ernährten Kaninchen als normal bezeichnet. Als Maximalwert fanden wir 161 mg, als Minimalwert 59 mg; die Durchschnittsziffer von 66 Bestimmungen an neun Kaninchen vor den jeweiligen Versuchen betrug 96 mg.

Bei Hunden sind die Schwankungen des Blutzuckergehalts geringer:

Bei normal ernährten Tieren bis zu einer Nüchternzeit von 24 Stunden: 65–125 mg % (28 Bestimmungen an vier Hunden).

4

I. WALTER KEMPNER.

Bei Hungerhunden (24—307 Stunden): 53—94 mg (8 Bestimmungen an drei Hunden).

Bei einem Hund mit Eckscher Fistel¹⁾: Nüchternwerte (15—20 Stunden): 81—101 mg (7 Bestimmungen).

Bei den Hungerhunden sind die niederen Ziffern natürlich nicht nur abhängig von der Dauer der Nahrungskarenz. Bei einem Hund, der über 12 Tage gehungert hatte, war der Zuckergehalt normal: 72 mg.

Systematische Untersuchungen bei Hunger, Hunger und Phlorhizin, Ernährungsstörungen und Phlorhizin, sowie die hierher gehörige Literatur bei Junkersdorf und seinen Schülern²⁾.

Bei Beurteilung der Blutzuckerkurven nach Phlorhizinierung wurde natürlich auch der jeweilige Ausgangswert berücksichtigt.

Die Versuchstiere waren bei ungefähr konstanter kohlehydratreicher Nahrung: Kaninchen wurde Hafer, Brot, Rüben, Kohl und Heu gegeben, Hunden Reste der Patientenkost und Fleisch, Schmalz und Reis.

Der Blutzucker wurde nach Hagedorn-Jensen im Ohrvenenblut, der Harnzucker nach Bertrand bestimmt.

Kaninchen 1. Gewicht: 2900 g. Im Käfig: bei konstanter kohlehydratreicher Nahrung. 30. VI. bis 10. VIII. 1926. Phlorhizindosis 0,005—5,0 g.

| Datum und Zeit | Blutzucker in mg% | | Datum und Zeit | Blutzucker in mg% | |
|---------------------|-------------------|--------------------|---------------------|-------------------|------------------|
| 30. VI. 1926 | | | 10 ^h 00' | 109 | |
| 9 ^h 30' | 91 | | 10 ^h 35' | 104 | |
| 11 ^h 50' | 88 | | 11 ^h 10' | 100 | |
| 4 ^h 50' | 84 | | 11 ^h 45' | 95 | |
| 1. VII. 1926 | | | 12 ^h 20' | 93 | |
| 8 ^h 15' | — | 0,005 g Phlorhizin | 6. VII. 1926 | | |
| 8 ^h 20' | 99 | | 9 ^h 00' | — | 0,1 g Phlorhizin |
| 9 ^h 30' | 94 | | 9 ^h 10' | 110 | |
| 10 ^h 05' | 87 | | 10 ^h 10' | 110 | |
| 10 ^h 35' | 84 | | 11 ^h 10' | 98 | |
| 11 ^h 00' | 78 | | 12 ^h 10' | 90 | |
| 11 ^h 35' | 89 | | 3 ^h 20' | 80 | |
| 12 ^h 05' | 89 | | 7. VII. 1926 | | |
| 5. VII. 1926 | | | 9 ^h 35' | — | 0,1 g Phlorhizin |
| 9 ^h 20' | — | 0,1 g Phlorhizin | 9 ^h 50' | 109 | |
| 9 ^h 30' | 118 | | 11 ^h 00' | 105 | |

1) Herrn Oberarzt Dr. Kleinschmidt für die freundliche Überlassung des Tieres auch an dieser Stelle meinen besten Dank.

2) Pfügers Arch. f. d. ges. Physiol. 1922, Bd. 197, S. 500; 1923, Bd. 200, S. 443; 1924, Bd. 204, S. 127; 1925, Bd. 207, S. 433.

Zur Kenntnis des Phlorhizindiabetes.

5

| Datum und Zeit | Blutzucker in mg% | | Datum und Zeit | Blutzucker in mg% | |
|---------------------|-------------------|--|---------------------|-------------------|---|
| 12 ^h 10' | 89 | | 11 ^h 20' | 73 | |
| 1 ^h 10' | 91 | | 11 ^h 55' | 61 | |
| 2 ^h 35' | 75 | | 12 ^h 55' | 81 | |
| 4 ^h 00' | 77 | | 4 ^h 00' | 75 | |
| 5 ^h 35' | 86 | | 21. VII. 1926 | | |
| 7 ^h 00' | 82 | | 8 ^h 15' | 65 | |
| 9. VII. 1926 | | | 8 ^h 20' | — | 1,0 g Phl. (4,0 ccm 15%iges Na ₂ CO ₃) |
| 9 ^h 50' | 75 | | 9 ^h 00' | 76 | |
| 9 ^h 55' | — | 0,1 g Phlorhizin | 9 ^h 40' | 65 | |
| 12 ^h 30' | 72 | | 10 ^h 25' | 74 | |
| 5 ^h 50' | 61 | | 11 ^h 10' | 65 | |
| 10. VII. 1926 | | | 12 ^h 20' | 67 | |
| 9 ^h 45' | 80 | | 2 ^h 50' | 70 | |
| 9 ^h 50' | — | 0,1 g Phlorhizin | 5 ^h 20' | 29 | |
| 10 ^h 15' | 85 | | 23. VII. 1926 | | |
| 10 ^h 40' | 89 | | 8 ^h 10' | — | 0,9 g Phl. (4,0 ccm 15%iges Na ₂ CO ₃) |
| 11 ^h 15' | 94 | | 11 ^h 10' | 97 | |
| 12. VII. 1926 | | | 4 ^h 10' | 111 | |
| 9 ^h 20' | 98 | | 5 ^h 40' | 97 | |
| 9 ^h 25' | — | 0,1 g Phl. (0,5 ccm 15%iges Na ₂ CO ₃) | 26. VII. 1926 | | |
| 9 ^h 50' | 93 | | 9 ^h 50' | — | 2,0 g Phl. (10 ccm 15%iges Na ₂ CO ₃) |
| 10 ^h 25' | 98 | | 10 ^h 00' | 154 | |
| 10 ^h 55' | 93 | | 10 ^h 30' | 143 | |
| 12 ^h 10' | 77 | | 11 ^h 35' | 134 | |
| 6 ^h 10' | 72 | | 12 ^h 50' | 122 | |
| 13. VII. 1926 | | | 4 ^h 10' | 117 | |
| 10 ^h 20' | 66 | | 6 ^h 10' | 120 | |
| 10 ^h 25' | — | 0,15 g Phl. (0,5 ccm 15%iges Na ₂ CO ₃) | 27. VII. 1926 | | |
| 11 ^h 00' | 77 | | 11 ^h 10' | 134 | |
| 11 ^h 35' | 61 | | 28. VII. 1926 | | |
| 12 ^h 10' | 61 | | 12 ^h 30' | 127 | |
| 12 ^h 50' | 52 | | 29. VII. 1926 | | |
| 4 ^h 10' | 66 | | 10 ^h 40' | 134 | |
| 15. VII. 1926 | | | 30. VII. 1926 | | |
| 10 ^h 40' | 70 | | 11 ^h 00' | 139 | |
| 19. VII. 1926 | | | 6. VIII. 1926 | | |
| 8 ^h 10' | 61 | | 1 ^h 30' | 117 | |
| 8 ^h 15' | — | 0,75 g Phl. (3,0 ccm 15%iges Na ₂ CO ₃) | 1 ^h 55' | — | 3,0 g Phl. (10 ccm 15%iges Na ₂ CO ₃) |
| 8 ^h 40' | 61 | | 2 ^h 18' | 124 | |
| 9 ^h 15' | 72 | | 2 ^h 58' | 106 | |
| 9 ^h 45' | 82 | | 5 ^h 55' | 125 | |
| 10 ^h 20' | 87 | | | | |
| 10 ^h 50' | 70 | | | | |

| Datum und Zeit | Blutzucker in mg % | | Datum und Zeit | Blutzucker in mg % | |
|---------------------|--------------------|--|---------------------|--------------------|--|
| 9. VIII. 1926 | | | 3 ^h 35' | 178 | |
| 9 ^h 55' | 118 | | 4 ^h 00' | 176 | |
| 10 ^h 00' | — | 5,0 g Phl. (20 ccm 15%iges Na ₂ CO ₃) | 5 ^h 15' | 137 | |
| 10 ^h 20' | 132 | | 12. VIII. 1926 | | |
| 10 ^h 50' | 153 | | 10 ^h 20' | 146 | |
| 11 ^h 30' | 170 | | 10 ^h 32' | — | 20 ccm 15%iges Na ₂ CO ₃ |
| 3 ^h 30' | 153 | | 10 ^h 44' | 168 | |
| 6 ^h 10' | 129 | | 11 ^h 07' | 182 | |
| 10. VIII. 1926 | | | 11 ^h 44' | 172 | |
| 12 ^h 00' | 120 | | 12 ^h 22' | 168 | |
| 1 ^h 35' | 114 | | 1 ^h 04' | 146 | |
| 2 ^h 15' | — | 5,0 g Phl. (20 ccm 15%iges Na ₂ CO ₃) | 3 ^h 00' | 124 | |
| 2 ^h 35' | 181 | | 4 ^h 00' | 139 | |
| | | | 5 ^h 50' | 136 | |

Schwankungen der Blutzuckerausgangszahlen an 42 Tagen von 61—146 mg %.

Ein Teil der Kurven mit absteigender Richtung, aber ohne regelmäßigen Zeitpunkt eines beginnenden Abstiegs und innerhalb der normalen Grenzen.

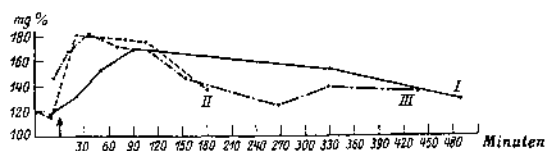
An 2 Versuchstagen hypoglykämische Werte:

| | | |
|----------|--|----------|
| 13. VII. | 145 Minuten nach 0,15 g Phlorhizin von . . . | 66—52 mg |
| 21. VII. | 390 » » 1,0 » » konstant bei | 65—70 » |
| | 540 » von | 70—29 » |

Ob an diesen beiden Tagen eine Ernährungsstörung bestand, ist nicht festgestellt.

Bei subkutaner Injektion von 5,0 g Phlorhizin in 20 ccm 15%iger Natriumkarbonatlösung: Hyperglykämie nach 20 Minuten beginnend von 118—170 mg und 114—181 mg.

Bei subkutaner Injektion von 20 ccm 15%iger Natriumkarbonatlösung ohne Phlorhizin: Hyperglykämie nach 12 Minuten beginnend von 146—182 mg.



Kurve 3. — I. = 9. VIII. 1926 und --- II. = 10. VIII. 1926 5,0 g Phlorhizin in 20 ccm 15%iges Na₂CO₃. - - - - III. = 12. VIII. 1926 20 ccm 15%iges Na₂CO₃.

Zur Kenntnis des Phlorhizindiabetes.

7

Also keine Hyperglykämie durch Phlorhizin.

Ergebnis: Bei 94 Blutzuckerbestimmungen im Verlauf einer Phlorhizinfütterungsperiode von 40 Tagen bei interkurrierender Darreichung von 0,005—5,0 g Phlorhizin zwei hypoglykämische Werte. Schwankungen an den einzelnen Tagen und den verschiedenen Versuchstagen untereinander ohne bestimmbare Regelmäßigkeit.

Kaninchen 2. Gewicht: 2650 g. Im Käfig: 12—18 Stunden nüchtern.
Phlorhizindosis 0,05—3,0 g.

| Datum und Zeit | Blutzucker in mg% | | Datum und Zeit | Blutzucker in mg% | |
|---------------------|-------------------|---|---------------------|-------------------|--|
| 29. VII. 1926 | | | 4. VIII. 1926 | | 12 Stund. nüchtern |
| 10 ^h 40' | 112 | | 11 ^h 00' | 111 | |
| 30. VII. 1926 | | | 11 ^h 20' | | 3 g Phl. (15 ccm) |
| 11 ^h 00' | 124 | | 11 ^h 30' | 112 | |
| 2. VIII. 1926 | | 18 Stund. nüchtern | 11 ^h 55' | 126 | |
| 10 ^h 00' | 161 | | 12 ^h 20' | 148 | |
| 10 ^h 05' | | 2 g Phl. (7 ccm 15 %iges Na ₂ CO ₃) | 12 ^h 40' | 143 | |
| 10 ^h 25' | 216 | | 5. VIII. 1926 | | 12 Stund. nüchtern |
| 11 ^h 15' | 162 | | 10 ^h 35' | 141 | |
| 12 ^h 10' | 143 | | 10 ^h 45' | | 3 g Phl. (10 ccm) |
| 1 ^h 35' | 130 | | 10 ^h 57' | 118 | |
| 5 ^h 35' | 117 | | 11 ^h 25' | 108 | |
| 3. VIII. 1926 | | 18 Stund. nüchtern | 12 ^h 10' | 120 | |
| 11 ^h 30' | 122 | | 5 ^h 20' | 114 | |
| 11 ^h 40' | | 2 g Phl. (7 ccm) | 11. I. 1927 | | 18 Stund. nüchtern |
| 11 ^h 50' | 130 | | 10 ^h 24' | 81 | |
| 12 ^h 10' | 127 | | 10 ^h 25' | | 0,05 mg Phl. (1,5 ccm 1,0 %iges Na ₂ CO ₃) |
| 12 ^h 35' | 125 | | 10 ^h 36' | 101 | |
| 1 ^h 10' | 128 | | 10 ^h 48' | 75 | |
| 1 ^h 55' | 122 | | 11 ^h 03' | 85 | |
| | | | 11 ^h 25' | 79 | |

Im Sommer höhere Blutzuckerwerte als im Winter. Bei der ersten Injektion von 7 und 15 ccm nach 20 und 35 Minuten beginnende Hyperglykämie (s. Kaninchen 1). Kein Blutzuckerwert unter 75 mg.

Ergebnis: Keine Hypoglykämie bei regelmäßig ernährtem Nüchternkaninchen während 4tägiger Phlorhizinierung.

Kaninchen 3. Gewicht: 3550 g. Im Käfig: 16—17 Stunden nüchtern.
Fütterung mit kohlehydratreicher Nahrung.

| Datum und Zeit | Blutzucker in mg ^o / _o | | Datum und Zeit | Blutzucker in mg ^o / _o | |
|-------------------------|--|--|---------------------|--|--|
| 16.VIII.1926 | | 16 Stund. nüchtern | 19.VIII.1926 | | 16 Stund. nüchtern |
| 10 ^h 00' | 111 | | 9 ^h 30' | 76 | |
| 11 ^h 52' bis | | 5 g Phl. (30 cem | 10 ^h 00' | | 1 mg Adrenalin |
| 12 ^h 00' | | 1,2 ^o / _o iges Na ₂ CO ₃) | 11 ^h 00' | 144 | |
| 12 ^h 05' | 135 | | 12 ^h 00' | 173 | |
| 12 ^h 55' | 143 | | 1 ^h 00' | 173 | |
| 1 ^h 35' | 160 | | 2 ^h 00' | 136 | |
| 3 ^h 30' | 149 | | | | |
| 6 ^h 20' | 109 | | 7. IX. 1926 | | |
| 17.VIII.1926 | | 17 Stund. nüchtern | 6 ^h 00' | 86 | |
| 11 ^h 20' | 128 | | 8. IX. 1926 | | 16 Stund. nüchtern |
| 11 ^h 30' | | 1 mg Adrenalin | 10 ^h 20' | 79 | |
| | | subkutan | 11 ^h 05' | 102 | |
| 11 ^h 50' | 129 | | 11 ^h 10' | | 0,5 g Phl. (5,0 cem |
| 12 ^h 25' | 168 | | | | 1,2 ^o / _o iges Na ₂ CO ₃) |
| 12 ^h 50' | 196 | | 12 ^h 25' | 88 | |
| 1 ^h 20' | 198 | | 1 ^h 20' | 90 | |
| 2 ^h 10' | 170 | | 2 ^h 25' | 92 | |
| 3 ^h 00' | 145 | | 4 ^h 45' | 84 | |
| 4 ^h 00' | 134 | | 6 ^h 10' | 80 | |
| 5 ^h 00' | 104 | | | | |
| 6 ^h 30' | 95 | | 9. IX. 1926 | | 16 Stund. nüchtern |
| 18.VIII.1926 | | 16 Stund. nüchtern | 10 ^h 00' | 81 | |
| 9 ^h 30' | 122 | | 11 ^h 00' | | 0,3 g Phl. (7 cem |
| 11 ^h 00' bis | | 3 g Phl. (35 cem | | | 1,2 ^o / _o iges Na ₂ CO ₃) |
| 11 ^h 10' | | 1,2 ^o / _o iges Na ₂ CO ₃) | 12 ^h 05' | 86 | |
| 11 ^h 35' | 154 | | 2 ^h 00' | 79 | |
| 12 ^h 35' | 139 | | 6 ^h 10' | 95 | |
| 1 ^h 40' | 127 | | | | |
| 3 ^h 30' | 123 | | 10. IX. 1926 | | 17 Stund. nüchtern |
| 5 ^h 50' | 102 | | 11 ^h 05' | 89 | |

Abwechselnde Phlorhizin- und Adrenalininjektionen an vier aufeinanderfolgenden Tagen bei gleichbleibender Nahrung.

Die Hyperglykämie nach Injektion großer Flüssigkeitsmengen bleibt bei Injektion geringerer Mengen aus.

Ergebnis: Nach Phlorhizingabe von 0,3—5,0 g bei regelmäßig ernährtem Nüchternkaninchen kein Sinken der Blutzuckerkurve. Keine hypoglykämische Zahl.

Die Adrenalinhyperglykämie beim Phlorhizinnüchterntier nicht vermindert.

Zur Kenntnis des Phlorhizindiabetes.

9

Kaninchen 4. Gewicht: 2800 g. Im Käfig, hungert.

| Datum und Zeit | Blutzucker in mg ⁰ / ₀ | | Datum und Zeit | Blutzucker in mg ⁰ / ₀ | |
|---------------------|--|--------------------------------------|---------------------|--|------------------|
| 16.VIII.1926 | | 16 Stunden nüchtern | 18.VIII.1926 | | 63 Stund. Hunger |
| 10 ^h 05' | 132 | | 9 ^h 35' | 135 | |
| 10 ^h 15' | | 1,4 g Phl. (10 ccm ölige Suspension) | 10 ^h 00' | | 1 mg Adrenalin |
| | | | 10 ^h 30' | 221 | |
| 12 ^h 15' | 124 | | 11 ^h 30' | 241 | |
| 3 ^h 30' | 136 | | 12 ^h 30' | 243 | |
| | | | 1 ^h 45' | 189 | |
| 17.VIII.1926 | | 41 Stund. Hunger | 3 ^h 20' | 165 | |
| 11 ^h 25' | 147 | | 5 ^h 45' | 115 | |
| 5 ^h 10' | 102 | | 19.VIII.1926 | | 87 Stund. Hunger |
| | | | 9 ^h 35' | 87 | |

Ergebnis: Keine Veränderung des Blutzuckergehalts trotz maximaler Phlorhizinierung und 87stündigem Hunger.

Die Adrenalinhyperglykämie beim Phlorhizinhungerkaninchen nicht vermindert.

Kaninchen 5. Gewicht: 1270 g. Ungefähr 100 Tage alt.

| Datum und Zeit | Blutzucker in mg ⁰ / ₀ | | Datum und Zeit | Blutzucker in mg ⁰ / ₀ | |
|---------------------|--|---|---------------------|--|--|
| 8. X. 1926 | | | 11 ^h 15' | 125 | |
| 10 ^h 15' | 123 | bis zum Beginn des Versuchs Futter im Käfig | 11 ^h 55' | 110 | |
| | | 0,5 g Phl. (10 ccm 1,2 ⁰ / ₀ iges Na ₂ CO ₃) | 12 ^h 20' | 113 | |
| 10 ^h 20' | | | 1 ^h 20' | 101 | |
| | | | 2 ^h 20' | 88 | |
| 10 ^h 55' | 129 | | 3 ^h 20' | 94 | |
| | | | 5 ^h 40' | 95 | |

Kaninchen 6. Gewicht: 1810 g. Ungefähr 100 Tage alt.

| Datum und Zeit | Blutzucker in mg ⁰ / ₀ | | Datum und Zeit | Blutzucker in mg ⁰ / ₀ | |
|--------------------|--|---|---------------------|--|--|
| 11. X. 1926 | | | 10 ^h 35' | 151 | |
| 9 ^h 13' | 123 | 13 Stunden nüchtern | 11 ^h 45' | 127 | |
| | | 1,0 g Phl. (20 ccm 1,2 ⁰ / ₀ iges Na ₂ CO ₃) | 12 ^h 50' | 109 | |
| 9 ^h 15' | | | 1 ^h 50' | 111 | |
| | | | 4 ^h 00' | 120 | |
| 9 ^h 50' | 135 | | 5 ^h 30' | 117 | |

Normale Blutzuckerausgangswerte bei beiden Tieren. Geringes Sinken der Blutzuckercurve bei Kaninchen 5 (gefüttert), 3—4 Stunden

10

I. WALTER KEMPNER.

nach 0,5 g Phlorhizin. Bei Kaninchen 6 (»nüchtern«) nach 1,0 g Phlorhizin in 20 ccm schwacher Natriumkarbonatlösung: rasch einsetzende »Injektions«-Hyperglykämie, 150—495 Minuten p. i. konstante Blutzuckerwerte.

Ergebnis: Keine hypoglykämische Zahl bei jungen gefütterten und Nüchternphlorhizinkaninchen.

Hund 1. Gewicht: 14,4 kg. Im Käfig. Fütterung mit gemischter Nahrung.

| Datum und Zeit | Blutzucker in mg % | | Datum und Zeit | Blutzucker in mg % | |
|------------------------------|-----------------------|--|---------------------|-----------------------|--|
| 30. VIII. 1926 | | | | | Essen |
| 10 ^h 40' | 88 | | 2.—3. IX. 1926 | | 1150 ccm Urin, 2,75 % Glykose, 31,6 g Gesamt- glykose |
| 12 ^h 00' | | Essen | | | |
| 3 ^h 00' | 114 | | | | |
| 31. VIII. 1926 | | 20 Stund. nüchtern | 3. IX. 1926 | | |
| 10 ^h 25' | 81 | | 6 ^h 00' | 73 | |
| 12 ^h 35' | 79 | | 3.—4. IX. 1926 | | 1270 ccm Urin, 3,4 % Glykose, 43,18 g Gesamtglykose |
| 1 ^h 55' | 83 | | | | 15 Stund. nüchtern |
| 31. VIII. bis 1. IX. 1926 | | 1060 ccm Urin, Al- bumen +, Gly- kose — | 4. IX. 1926 | | |
| 1. IX. 1926 | | | 10 ^h 00' | 89 | |
| 8 ^h 00' | | Essen | 10 ^h 40' | 68 | |
| 9 ^h 00' | 112 | | 12 ^h 00' | | Essen |
| 9 ^h 20' | | 1,0 g Phl. (10 ccm 1,2 % iges Na ₂ CO ₃) | 4.—5. IX. 1926 | | 1180 ccm Urin, 2,2 % Glykose, 26,0 g Gesamtglykose |
| 10 ^h 10' | 104 | | 5.—6. IX. 1926 | | Menge verschüttet, im Erhaltenen 6,7 % Glykose |
| 11 ^h 20' | 99 | | | | 21 Stund. nüchtern |
| 1 ^h 10' | 89 | | 6. IX. 1926 | | |
| 3 ^h 20' | 90 | | 9 ^h 30' | 84 | |
| 4 ^h 00' | 89 | | 10 ^h 30' | 84 | |
| | | Essen | 12 ^h 10' | 82 | |
| 4 ^h 45' | 93 | | 4 ^h 10' | 77 | |
| 6 ^h 20' | 96 | | 6 ^h 20' | 75 | |
| 1.—2. IX. 1926 | | 840 ccm Urin, 2,55 % Glykose, 21,5 g Gesamtglykose | | | Essen |
| 2. IX. 1926 | | 17 Stund. nüchtern | 6.—7. IX. 1926 | | 950 ccm Urin, 1,65 % Glykose, 15,7 g Gesamtglykose |
| 9 ^h 55' | 125 | | | | 15 Stund. nüchtern |
| 10 ^h 00' | | 1,0 g Phl. (6 ccm 1,2 % iges Na ₂ CO ₃) | 7. IX. 1926 | | |
| 10 ^h 50' | 115 | | 9 ^h 30' | 75 | |
| 12 ^h 15' | 82 | | 11 ^h 30' | 88 | |
| 2 ^h 05' | 78 | | 3 ^h 30' | 82 | |
| 4 ^h 00' | 76 | | 5 ^h 40' | 66 | |
| 6 ^h 00' | 71 | | | | Essen |

Zur Kenntnis des Phlorhizindiabetes.

11

| Datum und Zeit | Blutzucker in mg % | | Datum und Zeit | Blutzucker in mg % | |
|---------------------|-----------------------|--|---------------------|-----------------------|---|
| 7.—8. IX. 1926 | | 920 ccm Urin, Glykose — | 2 ^h 40' | 98 | |
| | | | 5 ^h 50' | 87 | |
| 8. IX. 1926 | | 16½ Stund. nüchtern | 10.—11. IX. 1926 | | 1530 ccm Urin, 3,65 % Glykose, 55,8 g Gesamtglykose |
| 10 ^h 10' | 96 | | | | 17 Stund. nüchtern |
| 12 ^h 20' | 86 | | 11. IX. 1926 | | |
| 2 ^h 30' | 84 | | 11 ^h 00' | 90 | Essen |
| 6 ^h 00' | 65 | Essen | 1 ^h 00' | | |
| 7 ^h 00' | | Urin: Glykose — | 11.—12. IX. 1926 | | 1500 ccm Urin, 3,1 % Glykose, 46,5 g Gesamtglykose |
| 8.—9. IX. 1926 | | 14 Stund. nüchtern | | | 1740 ccm Urin, 2,1 % Glykose, 36,5 g Gesamtglykose |
| 9. IX. 1926 | | | 12.—13. IX. 1926 | | 20 Stund. nüchtern |
| 9 ^h 50' | 114 | 1,5 g Phl. (15 ccm 1,2 % iges Na ₂ CO ₃) | | | |
| 10 ^h 35' | | | 13. IX. 1926 | | |
| 11 ^h 15' | 99 | | 12 ^h 00' | 102 | |
| 12 ^h 00' | 105 | | 6 ^h 00' | 91 | |
| 12 ^h 50' | 87 | | 13.—14. IX. 1926 | | 1500 ccm Urin, 2,5 % Glykose, 37,5 g Gesamtglykose |
| 2 ^h 10' | 103 | | | | 24 Stund. nüchtern |
| 6 ^h 00' | 82 | | 15. IX. 1926 | | |
| 9.—10. IX. 1926 | | 1100 ccm Urin, 1,8 % Glykose, 19,8 g Gesamtglykose | 11 ^h 30' | 92 | |
| 10. IX. 1926 | | 15 Stund. nüchtern | 15.—16. IX. 1926 | | Urin: Glykose ++ |
| 9 ^h 30' | 90 | | 16.—17. IX. 1926 | | 590 ccm Urin, 3,3 % Glykose, 19,5 g Gesamtglykose |
| 9 ^h 50' | | 4 g Phl. (40 ccm 1,2 % iges Na ₂ CO ₃) | 17.—18. IX. 1926 | | 1250 ccm Urin, Glykose — |
| 10 ^h 00' | 97 | | | | |
| 10 ^h 55' | 110 | | | | |
| 11 ^h 50' | 89 | | | | |

Bei 36 Blutzuckerbestimmungen im Verlauf einer Phlorhizinfütterungsperiode von 11 Tagen bei interkurrierender Darreichung von 1,0—4,0 g Phlorhizin: Blutzuckerschwankungen zwischen 125—68 mg %.

Bei 15 Blutzuckerbestimmungen desselben Hundes bei ungefähr gleicher Nahrung ohne Phlorhizin: Schwankungen zwischen 114—65 mg.

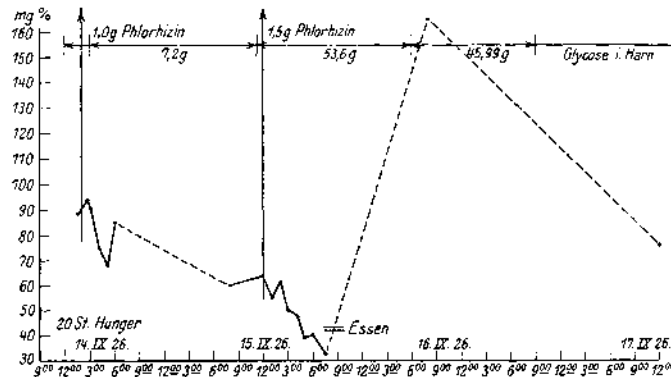
Einmal am 2. IX.: Nach 1,0 g Phlorhizin Kurve mit ausgeprägt absteigender Richtung von 125—71 mg.

Keine hypoglykämische Zahl.

Ergebnis: Bei einer Gesamtglykosurie von 354 g während einer Phlorhizinfütterungsperiode von 11 Tagen keine Hypoglykämie. Die Schwankungen an den einzelnen Tagen und den verschiedenen Versuchstagen untereinander ohne bestimmbare Regelmäßigkeit. Kein Unterschied zwischen dem Blutzuckergehalt der phlorhizinfreien Fütterungsperiode und der vorausgehenden Phlorhizinfütterungsperiode.

Hund 4. Gewicht: 8400 g. Im Käfig.

Bei in gutem Ernährungszustand befindlichem Phlorhizinhund während einer Nahrungskarenz von 20—24 Stunden: Blutzuckergehalt



Kurve 4.

mit geringen Schwankungen konstant, Anfangswert 89 mg, Endwert 85 mg.

Nach 38—42 Stunden Hunger und andauernder Phlorhizinwirkung: 60—64 mg.

Im Verlauf der nächsten 7 Stunden bei weiterer Nahrungskarenz und neuer Phlorhizingabe starke Hypoglykämie bis auf 32 mg. Nach Fütterung am gleichen Abend Ansteigen bis zum nächsten Morgen auf 165 mg.

In einer späteren Phlorhizinfütterungsperiode beim gleichen Tier trotz längerer Phlorhizinwirkung und einer Glykosurie von über 100 g keine hypoglykämischen Zahlen.

Ergebnis: Phlorhizin beim normal ernährten Hund bis zu einer Karenzzeit von 24 Stunden ohne herabsetzende Wirkung auf den Blutzucker.

Nach 42 stündigem Hunger niedrige, noch normale Werte. Bei längerer Hunger- und Phlorhizinwirkung starke Hypoglykämie, nach Nahrungszufuhr hyperglykämische Zahl.

Trotz 4 stündiger Hypoglykämie unter 50 mg und 2 stündiger unter 40 mg keinerlei Intoxikationserscheinungen, bei einem Blutzuckergehalt von 41—53 mg des gleichen Tieres durch Insulinwirkung schwere Krämpfe.

Zur Kenntnis des Phlorhizindiabetes.

13

Die Stärke der Hypoglykämie nach Hunger und Phlorhizin wechselt bei den verschiedenen Versuchstieren, ohne bestimmbare Abhängigkeit von der Stärke der Glykosurie.

| Hund Nr. | Hunger in Stunden | Phlorhizin in Stunden | in g | Blutzucker in mg | Harozucker in g |
|----------|-------------------|-----------------------|------|------------------|-----------------|
| 1 | 93 | 93 | 1,5 | 45 | 87,92 |
| 2 | 20 | 17 | 3,0 | 76 | 2,25 |
| | 95 | 71 | 2,2 | 50 | 54,69 |
| | 91 | 87 | 2,5 | 44 | 99,68 |
| 3 | 15 | 135 | 3,0 | 122 | 232,4 |
| | 20 | 15 | 4,0 | 110 | 20,7 |
| 4 | 16 | 17 | 1,0 | 95 | 9,0 |
| | 17 | 17 | 4,0 | 80 | 30,1 |
| | 20 | 46 | 1,0 | 92 | 38,7 |
| | 20 | 86 | 3,0 | 65 | 110,8 |
| | 20 | 158 | 3,0 | 103 | 297,8 |
| | 49½ | 30 | 2,5 | 32 | etwa 15,0 |

Ergebnis: Blutzuckergehalt beim Phlorhizinhund bis zu einer Nüchternzeit von 20 Stunden trotz maximaler Glykosurie normal. Bei länger andauernder Hunger- + Phlorhizinwirkung: Hypoglykämie.

Hund 5. Gewicht: 9150 g. Mit Eckscher Fistel. In schlechtem Ernährungszustand.

| Datum und Zeit | Blutzucker in mg% | | Datum und Zeit | Blutzucker in mg% | |
|------------------------------|-------------------|---|------------------------------|-------------------|---|
| 21. X. 1926 | | 20 Stund. nüchtern | 21.—22. X. 1926 | | |
| 9 ^h 15' | 101 | 0,5 g Phl. (10 ccm 1,2%iges Na ₂ CO ₃) | 6 ^h 00' p. m. bis | | 650 ccm Urin, 0,96% Glykose, 6,2 g Gesamtglykose |
| 9 ^h 20' | | | 9 ^h 00' a. m. | | |
| 10 ^h 00' | 90 | | 22. X. 1926 | | |
| 11 ^h 20' | 81 | | 9 ^h 15' | 93 | 14 Stund. nüchtern |
| 12 ^h 20' | 104 | | 9 ^h 00' bis | | 60 ccm Urin, Nylander (±), Bertrand: 0,072% |
| 3 ^h 50' | 74 | Essen (Fleisch, Schmalz und Reis) | 10 ^h 30' | | |
| 5 ^h 10' | 65 | | 10 ^h 45' | 83 | 3,0 g Phl. (40 ccm 1,2%iges Na ₂ CO ₃) |
| 6 ^h 10' | 50 | | 11 ^h 45' | 82 | |
| 6 ^h 10' bis | | | 12 ^h 45' | 77 | |
| 7 ^h 00' | | | 2 ^h 15' | 53 | |
| 9 ^h 00' a. m. bis | | 540 ccm Urin, 2,1% Glykose, 11,3 g Gesamtglykose | | | |
| 6 ^h 00' p. m. | | | | | |

14

I. WALTER KEMPNER.

| Datum und Zeit | Blutzucker in mg% | | Datum und Zeit | Blutzucker in mg% | |
|-------------------------------|----------------------|--------------------|------------------------------|----------------------|---|
| 3 ^h 25' | 52 | | 26.—27. X. 1926 | | |
| 4 ^h 35' | 43 | | 6 ^h 00' p. m. bis | | 750 ccm Urin, 1,6% |
| 5 ^h 45' | 47 | | 9 ^h 00' a. m. | | Glykose, 12,0 g |
| 10 ^h 30' a. m. bis | | 350 ccm Urin, 3,2% | | | Gesamtglykose |
| 6 ^h 00' p. m. | | Glykose, 11,2 g | 27. X. 1926 | | |
| | | Gesamtglykose | 9 ^h 35' | 94 | 15 Stund. nüchtern |
| 22.—23. X. 1926 | | | 15. XI. 1926 | | 20 „ |
| 6 ^h 00' p. m. bis | | 250 ccm Urin, 5,2% | 9 ^h 55' | 72 | |
| 9 ^h 00' a. m. | | Glykose, 13,0 g | 10 ^h 00' | | 4,0 g Phl. (30 ccm |
| | | Gesamtglykose | | | 10%iges Na ₂ CO ₃) |
| 23. X. 1926 | | 37 Stunden Hunger | 12 ^h 00' | 41 | |
| 8 ^h 00' | 63 | | 3 ^h 00' | 40 | |
| 9 ^h 00' | 63 | | 5 ^h 40' | 19 | |
| 9 ^h 10' | | Essen. | 15.—16. XI. 1926 | | 370 ccm Urin, 6,2% |
| 10 ^h 30' | 128 | | | | Glykose, 22,94 g |
| 12 ^h 00' | 126 | | | | Gesamtglykose |
| 23.—24. X. 1926 | | 980 ccm Urin, 7,2% | 16. XI. 1926 | | 43 Stunden Hunger |
| | | Glykose, 70,6 g | 9 ^h 00' | 50 | |
| | | Gesamtglykose | 10 ^h 00' | | 4,0 g Phl. (30 ccm |
| 24.—25. X. 1926 | | 900 ccm Urin, 5,4% | | | 10%iges Na ₂ CO ₃) |
| | | Glykose, 48,6 g | 11 ^h 40' | 33 | |
| | | Gesamtglykose | 1 ^h 40' | 34 | |
| 25. X. 1926 | | 20½ Std. nüchtern | 2 ^h 45' | | 2,0 g Phl. (20 ccm |
| 9 ^h 30' | 68 | | | | 10%iges Na ₂ CO ₃) |
| 12 ^h 00' | 75 | | 3 ^h 30' | 40 | |
| 3 ^h 50' | 54 | | 5 ^h 10' | 16 | |
| 5 ^h 50' | 29 | | 6 ^h 00' | 27 | |
| 9 ^h 00' a. m. bis | | Essen | 16.—17. XI. 1926 | | 530 ccm Urin, 5,0% |
| 6 ^h 00' p. m. | | 130 ccm Urin, 5,7% | | | Glykose, 26,5 g |
| | | Glykose, 7,4 g Ge- | | | Gesamtglykose |
| 25.—26. X. 1926 | | samtglykose | 17. XI. 1926 | | 67 Stunden Hunger |
| 6 ^h 00' p. m. bis | | 410 ccm Urin, 9,1% | 9 ^h 00' | 26 | |
| 9 ^h 00' a. m. | | Glykose, 37,3 g | 11 ^h 30' | 25 | |
| | | Gesamtglykose | 5 ^h 00' | 30 | |
| 26. X. 1926 | | | 9 ^h 00' a. m. bis | | 115 ccm Urin, 5,0% |
| 9 ^h 00' | 104 | | 6 ^h 00' p. m. | | Glykose, 5,75 g |
| 10 ^h 35' | 100 | | | | Gesamtglykose |
| 11 ^h 30' | 103 | Essen | 17.—18. XI. 1926 | | 90 ccm Urin, 5,8% |
| 12 ^h 30' | 101 | „ | 6 ^h 00' p. m. bis | | Glykose, 5,22 g |
| 4 ^h 00' | 80 | „ | 9 ^h 00' a. m. | | Gesamtglykose |
| 5 ^h 00' | 93 | „ | 18. XI. 1926 | | |
| 9 ^h 00' a. m. bis | | 140 ccm Urin, 2,6% | 8 ^h 39' | 44 | |
| 6 ^h 00' p. m. | | Glykose, 3,6 Ge- | | | |
| | | samtglykose | | | |

Nach 0,5 g Phlorhizin bei 20—29stündiger Nahrungskarenz Hypoglykämie von 101 auf 50 mg innerhalb von 9 Stunden.

14 Stunden nach Nahrungszufuhr normaler Blutzuckergehalt von 93 mg.

Nach erneuter Phlorhizinierung und Nahrungskarenz rasches Abfallen der Blutzuckerkurve innerhalb 6 Stunden von 83—43 mg.

Ansteigen des Blutzuckergehalts 10 Stunden nach der letzten Phlorhizingabe bei andauernder Nahrungskarenz (37 Stunden Hunger) auf 63. Tagesausscheidung von 24,2 g Glykose. Nach Nahrungszufuhr rasches Ansteigen des Blutzuckergehalts auf 128—126 mg, größere Harnzuckermengen von 70,6 g und 48,6 g in den nächsten 2 Tagen ohne neue Phlorhizingabe.

Bei erneutem Nahrungsentzug von 20 $\frac{1}{2}$ —27 Stunden und anhaltender Phlorhizinwirkung (letzte Gabe vor 71 Stunden) Sinken des Blutzuckergehalts von 68 auf 54 mg, nach 29 Stunden Hunger auf 29 mg. Glykoseausscheidung gering: 7,4 g in 9 Stunden.

Bei Nahrungszufuhr Blutzuckergehalt konstant bei starker Glykosurie: in 15 Stunden 37,3 g.

Bei größerer Phlorhizingabe schneller Beginn der Hypoglykämie:

Nach 22 Stunden Hunger und 2 Stunden Phlorhizin von 72 mg auf 41 mg.

» 28 » » » 8 » » » 72 » » 19 »

Ansteigen 23 Stunden nach der letzten Phlorhizingabe auf 50 mg. Urintagesmenge 22,9 g Glykose.

Nach erneuter Phlorhizingabe bei andauernder Nahrungskarenz (51 Stunden) innerhalb von 7 Stunden Hypoglykämie von 16 mg. In den nächsten 24 Stunden (51—75 Stunden Hunger) Blutzuckergehalt nicht über 30 mg, bei starker Glykosurie von 26,5 g in 24 Stunden.

42 Stunden nach der letzten Phlorhizingabe bei 100 Stunden Hunger Blutzuckergehalt von 44 mg.

Ergebnis: Rasches Sinken des Blutzuckergehalts bei einem Hund mit Eckscher Fistel nach Phlorhizin und Hunger.

Trotz andauernden Hungers Ansteigen des Blutzuckers bei nachlassender Phlorhizinwirkung.

Bei Nahrungszufuhr trotz starker Glykoseausscheidung Blutzuckergehalt normal.

Trotz lang dauernder oder rasch eintretender Hypoglykämie keine Intoxikationserscheinungen. Nach Insulin am gleichen Tier bei gleichen Blutzuckerzahlen schwere Krämpfe.

16

I. WALTER KEMPNER.

Hund 6. Phosphor-Hungerhund. 7. Hungertag. 3. Phosphortag (3mal 5 mg Phosphor in öliger Suspension).

Während der Hungertage und Hunger-Phosphortage vorher Schwankungen des Blutzuckergehalts zwischen 92—61 mg.

| Datum und Zeit | Blutzucker in mg% | | Datum und Zeit | Blutzucker in mg% | |
|---------------------|-------------------|------------------|--------------------|-------------------|---|
| 15. XII. 1926 | | | 1 ^h 10' | 45 | |
| 9 ^h 35' | 71 | | 3 ^h 40' | 42 | |
| 9 ^h 40' | | 1,0 g Phlorhizin | 5 ^h 20' | 43 | 300 ccm Urin, 2,3% Glykose, 6,9 g Gesamtglykose |
| 10 ^h 10' | 63 | | | | |
| 10 ^h 40' | 75 | | | | |
| 11 ^h 15' | 49 | | 16. XII. 1926 | | |
| 12 ^h 10' | 47 | | 8 ^h 50' | 84 | |

Bei einem Phosphorhungerhund mit normalen Blutzuckerzahlen zwischen 92—61 mg% während der Hunger- und Hungerphosphortage vorher trat nach subkutaner Injektion von 1,0 g Phlorhizin 95 Minuten p. i. eine Hypoglykämie von 49 mg% auf, bei mäßiger Glykosurie von 6,9 g im Tagesurin. Noch 7 Stunden nach der Phlorhizingabe betrug der Blutzuckergehalt 43 mg. 23 Stunden p. i. normale Blutzuckerzahl: 84 mg. Das Glykosebildungsvermögen des Phosphorhungerhundes ist also erhalten (Zuckerausscheidung im Harn, Ansteigen des Blutzuckergehalts auf normale Werte bei nachlassender Phlorhizinwirkung), die »Blutzuckerregulation« ist bei starker Vergiftung verändert (rasch einsetzende und lang anhaltende Hypoglykämie).

Bei über 250 Blutzuckerbestimmungen an sechs Kaninchen und sechs Hunden (davon ein Hund mit Eckscher Fistel und ein Phosphorhungerhund) nach verschiedener Menge und Wirkungsdauer des Phlorhizins ergab sich:

Bei normal ernährten Tieren konstanter Blutzuckergehalt, auch bei maximaler Glykosurie.

Bei Hungertieren Glykosurie vermindert, noch immer beträchtlich. Hypoglykämie von verschiedener Stärke und nach verschieden langer Phlorhizinierung. (Die niedrigsten Blutzuckerzahlen von 16 und 19 mg wurden beim hungernden Eck-Hund gefunden.)

Daß bei einer so beträchtlichen Zuckerausscheidung wie im Phlorhizindiabetes eine Neu- und Mehrbildung reduzierender Stoffe stattfindet, ist nicht zweifelhaft; sonst wäre der hypothetische Gesamtzuckergehalt des Blutes schon in kaum $\frac{1}{2}$ Stunde verbraucht. Daß aber

diese vermehrte Produktion erst sekundär und nur kompensierend beginnen soll, ohne daß sich bei einem normalen Tier jemals eine Hypoglykämie findet, die im Sinne eines Reizes die »Zuckerregulation« beeinflussen könnte, ist unwahrscheinlich. Auch die Blutzuckerkurven am Hungertier sprechen gegen diese Deutung des Phlorhizinmechanismus einer

- a) Glykosurie (»durch Schädigung der Nierenzellen«);
- b) Hypoglykämie (durch den Verlust der im Harn erscheinenden Zuckermenge);
- c) Normoglykämie (sekundäre »Regulation« durch die Zuckerreserven).

Denn die Hypoglykämie beginnt oft erst viele Stunden nach der Glykosurie und wird niemals »reguliert«, sondern hält bei wärendender Phlorhizinierung an bis zu neuer Nahrungszufuhr. Der Blutzucker-gehalt sinkt also nicht infolge der Entziehung von Zucker durch die Nieren, sondern als Folge funktioneller Insuffizienz der durch den Hunger geschädigten Leber, die zwar im Ruhezustand des Kohlehydrat-stoffwechsels den normalen Zuckergehalt des Blutes noch aufrecht erhalten kann, aber bei Mehrbeanspruchung versagt. Es ist also anzunehmen, daß beim Phlorhizindiabetes Zucker in verschiedenen Organen »gebildet« oder »ausgeschieden« wird, d. h. es handelt sich nicht um eine auswählende Beeinflussung des tubulären Nierenapparats, sondern um kombinierte Wirkungen auf funktionell verbundene Organ- oder Zellsysteme: ähnlich wie bei der Pankreas-»Zuckerharnruhr« die Glykosurie nicht nur durch das Überschreiten der hypothetischen Zuckerschwelle durch den vermehrten Blutzuckergehalt bedingt ist. (Die »Zuckerschwelle« — falls man überhaupt von einer solchen sprechen will — scheint übrigens beim Hund höher zu liegen als beim Menschen: bei mehrere Stunden wärendender Hyperglykämie über 200 und 250 mg% war im Urin bisweilen noch kein Zucker nachzuweisen.)

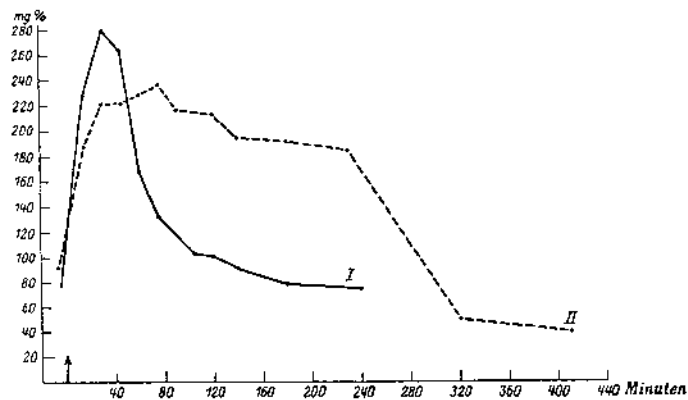
Daß es sich jedenfalls nicht nur um eine gesteigerte Zuckerdurchlässigkeit der Nieren handelt, wurde auch durch die Adrenalinkurven beim Phlorhizinkaninchen gezeigt. Hier müßten Höhe und Dauer der Hyperglykämie geringer sein als beim Normaltier. Das ergab sich nicht. Ebenso müßte bei Zuckerbelastung der Blutzuckergehalt schneller seine normalen Ausgangswerte erreichen, sofern das »Nierenfilter« durch die Phlorhizinwirkung »undicht« geworden sei und der Zucker aus dem Blut vermehrt in den Harn überträte, ohne den Zuckerabbau und -aufbau in der Leber zu verändern. Beim Phlorhizinhund (Kurve 5, II) dauert aber die Belastungshyperglykämie länger als beim Normaltier (I).

18

I. WALTER KEMPNER.

Hund 3.

| Datum und Zeit | Blutzucker in mg % | | Datum und Zeit | Blutzucker in mg % | |
|---------------------|--------------------|--------------------------------|---------------------|--------------------|--|
| 13. X. 1926 | | 20 Stunden nüchtern | 30. X. 1926 | | 20 Std. nüchtern, 15 Std. phlorhizinisiert (4,0 g), Glykoseausscheidung 20,7 g |
| 9 ^h 30' | 81 | | 9 ^h 35' | 110 | |
| 9 ^h 45' | | 100 g Glykose | 9 ^h 40' | | 100 g Glykose |
| 10 ^h 00' | 142 | | 9 ^h 52' | 117 | |
| 10 ^h 15' | 185 | | 10 ^h 08' | 136 | |
| 10 ^h 40' | 102 | | 10 ^h 28' | 169 | |
| 11 ^h 05' | 113 | | 10 ^h 50' | 167 | |
| 11 ^h 35' | 90 | | 11 ^h 15' | 169 | |
| 12 ^h 05' | 93 | | 11 ^h 40' | 145 | |
| 12 ^h 30' | 88 | | 12 ^h 10' | 152 | |
| | | Urin: kein Zucker nachzuweisen | 12 ^h 40' | 113 | |
| | | | 30.—31. X. 1926 | | Urin: 31,0 g Glykose |



Kurve 5. Hund 4. I. 20 Stunden nüchtern: 100 g Glykose. II. 20 Stunden nüchtern, 46 Stunden phlorhizinisiert (1,0 g): 100 g Glykose.

Diese verzögerten Belastungskurven (Kurve 6, II) sind beim Hungertier bekannt¹⁾ und werden durch Glykogenmangel der Leber und Fehlen von Assimilationsfermenten erklärt. Nach Hunger- und Phlorhizinwirkung wird die Dauer der Belastungshyperglykämie maximal (I).

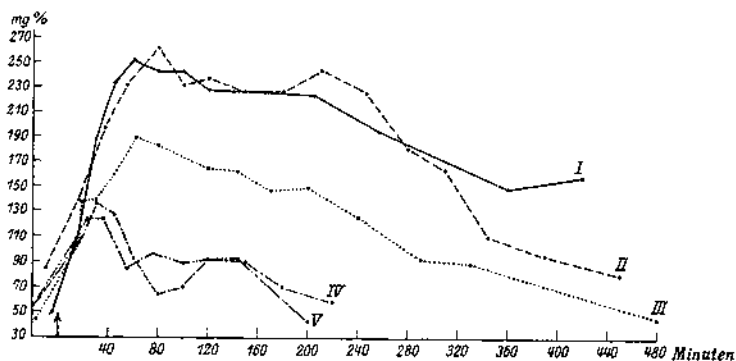
1) Literaturverzeichnis s. Eisner, Zeitschr. f. d. ges. exp. Med. 1926. Bd. 52, Hft. 1/2.

Zur Kenntnis des Phlorhizindiabetes.

19

Hund 1.

| Datum und Zeit | Blutzucker in mg ⁰ / ₁₀₀ | | Datum und Zeit | Blutzucker in mg ⁰ / ₁₀₀ | |
|---------------------|--|----------------|---------------------|--|--------------------------------|
| 25. X. 1926 | | 68 Std. Hunger | 11 ^h 45' | 310 | |
| 9 ^h 15' | 94 | | 12 ^h 20' | 323 | |
| 9 ^h 20' | | 100 g Glykose | 12 ^h 50' | 307 | |
| 9 ^h 35' | 172 | | 1 ^h 50' | 249 | |
| 9 ^h 45' | 195 | | 2 ^h 30' | 241 | |
| 9 ^h 55' | 228 | | 3 ^h 40' | 99 | |
| 10 ^h 15' | 261 | | 5 ^h 40' | 73 | |
| 10 ^h 45' | 266 | | | | Urin: kein Zucker nachzuweisen |
| 11 ^h 15' | 279 | | | | |



Kurve 6. Hund 2. 100 g Glykosebelastung. — I. = 95 Stunden Hunger + 71 Stunden Phlorhizin. Glykoseausscheidung 54,7 g. --- II. = 117 Stunden Hunger. III. = 91 Stunden Hunger + 87 Stunden Phlorhizin. Glykoseausscheidung 99,7 g : 50 Einheiten Insulin. - - - - IV. = 92 Stunden Hunger : 50 Einheiten Insulin. - - - - - V. = 140 Stunden Hunger : 50 Einheiten Insulin.

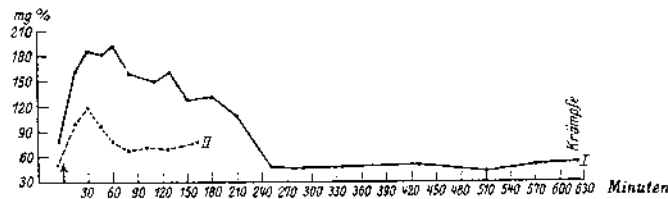
Bei gleichzeitiger Traubenzucker- und Insulingabe nach längerem Hunger (92—307 Stunden) verläuft die Belastungskurve wie beim Normaltier (Kurve 6, IV, V).

Hund 1.

| Datum und Zeit | Blutzucker in mg ⁰ / ₁₀₀ | | Datum und Zeit | Blutzucker in mg ⁰ / ₁₀₀ | |
|---------------------|--|------------------------------|---------------------|--|--|
| 9. XI. 1926 | | 94 St. Hunger | 11 ^h 36' | 183 | |
| 11 ^h 17' | 94 | | 11 ^h 50' | 203 | |
| 11 ^h 19' | | 50 Einheiten Insulin (Merek) | 12 ^h 05' | 198 | |
| 11 ^h 20' | | 100 g Glykose | 12 ^h 20' | 179 | |
| 11 ^h 34' | 170 | | 12 ^h 35' | 125 | |
| | | | 12 ^h 55' | 112 | |

| Datum und Zeit | Blutzucker in mg ⁰ / ₀ | | Datum und Zeit | Blutzucker in mg ⁰ / ₀ | |
|--------------------|--|--------------------------------|---------------------|--|--------------------------------|
| 1 ^h 10' | 89 | | 9 ^h 15' | | 100 g Glykose |
| 1 ^h 30' | 97 | | 9 ^h 30' | 102 | |
| 2 ^h 00' | 88 | | 9 ^h 45' | 126 | |
| 2 ^h 40' | 72 | | 10 ^h 00' | 146 | |
| 3 ^h 30' | 59 | | 10 ^h 15' | 148 | |
| 4 ^h 00' | 66 | | 10 ^h 35' | 147 | |
| 5 ^h 50' | 42 | | 10 ^h 55' | 136 | |
| | | Urin: kein Zucker nachzuweisen | 11 ^h 15' | 122 | |
| 3. I. 1927 | | 307 Std. Hunger | 11 ^h 45' | 124 | |
| 9 ^h 10' | 72 | | 12 ^h 15' | 106 | |
| 9 ^h 14' | | 50 Einheiten Insulin | 1 ^h 05' | 107 | |
| | | | | | Urin: kein Zucker nachzuweisen |

Beim Nüchterntier ist die Hyperglykämie nach Glykose- + Insulingabe natürlich geringer und von kürzerer Dauer (Kurve 7, II).



Kurve 7. Hund 4. 100 g Glykosebelastung + 40 Einheiten Insulin (17 Stunden nüchtern). I. 17 Stunden phlorhizinisiert. II. ohne Phlorhizin.

Beim Nüchtern- und Hungerphlorhizinhund (Kurve 7. I und 6, III) wird die Belastungshyperglykämie durch Insulin nicht kompensiert; die Höhe der Hyperglykämie ist zwar vermindert, die Dauer aber noch beträchtlich länger als beim Hungerinsulintier oder beim Normalhund.

Hund 1.

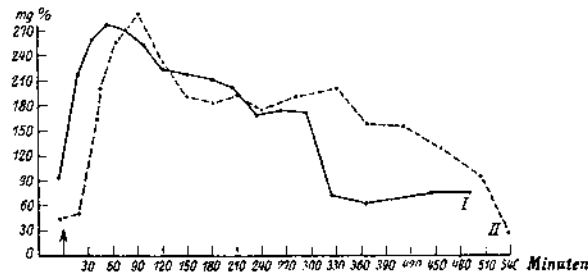
| Datum und Zeit | Blutzucker in mg ⁰ / ₀ | | Datum und Zeit | Blutzucker in mg ⁰ / ₀ | |
|--------------------|--|---|---------------------|--|---------------|
| 8. XII. 1926 | | 93 Std. Hunger + Phlorhizin (1,5 g), Glykoseausscheidung: 87,92 g | 9 ^h 25' | 38 | |
| | | | 9 ^h 30' | → | 100 g Glykose |
| | | | 9 ^h 45' | 104 | |
| 8 ^h 50' | 45 | | 10 ^h 05' | 133 | |
| 8 ^h 54' | | 50 Einh. Insulin | 10 ^h 24' | 139 | |
| 9 ^h 07' | 54 | | 10 ^h 40' | 168 | |
| | | | 11 ^h 00' | 211 | |

Zur Kenntnis des Phlorhizindiabetes.

21

| Datum und Zeit | Blutzucker in mg ^o / _o | | Datum und Zeit | Blutzucker in mg ^o / _o | |
|---------------------|--|--|--------------------|--|--------------------|
| 11 ^h 20' | 185 | | 2 ^h 35' | 158 | |
| 11 ^h 50' | 155 | | 3 ^h 15' | 153 | |
| 12 ^h 15' | 174 | | 3 ^h 55' | 149 | |
| 12 ^h 55' | 131 | | 4 ^h 54' | 99 | |
| 1 ^h 30' | 144 | | 5 ^h 40' | 42 | |
| 2 ^h 00' | 158 | | 8.--9. XII. 1926 | | Urin: 55 g Glykose |

Ähnlich wie die Phlorhizintiere verhielt sich ein Hund mit Eckscher Fistel: Nach 6tägiger Phlorhizinierung (221 g Glykoseausscheidung) und einer Nüchternzeit von 15 Stunden (bei nur noch minimaler Glykourie von 0,64 g während der Belastung) war die Dauer der Hyperglykämie beträchtlich verzögert (Kurve 8, I). Nach 4tägigem Hunger und 3tägiger Phlorhizinierung (61 g Glykoseausscheidung) bei während der Glykourie (27,8 g): Hyperglykämie maximal (II).



Kurve 8. 100 g Glykosebelastung beim Hund mit Eckscher Fistel.

Nach 7tägiger normaler und reichlicher Ernährung ohne Phlorhizingabe blieb die Belastungskurve hoch und verzögert.

Hund 5 (mit Eckscher Fistel).

| Datum und Zeit | Blutzucker in mg ^o / _o | | Datum und Zeit | Blutzucker in mg ^o / _o | |
|---------------------|--|------------------|---------------------|--|--------------------------------|
| 4. XI. 1926 | | 20 Std. nüchtern | 11 ^h 55' | 255 | |
| 9 ^h 13' | 83 | | 12 ^h 25' | 212 | |
| 9 ^h 15' | | 100 g Glykose | 1 ^h 05' | 174 | |
| 9 ^h 30' | 169 | | 1 ^h 40' | 128 | |
| 9 ^h 45' | 240 | | 2 ^h 25' | 90 | |
| 10 ^h 00' | 254 | | 2 ^h 55' | 57 | |
| 10 ^h 18' | 251 | | 3 ^h 55' | 66 | |
| 10 ^h 40' | 256 | | 5 ^h 55' | 70 | |
| 11 ^h 02' | 258 | | | | Urin: kein Zucker nachzuweisen |
| 11 ^h 25' | 258 | | | | |

22

I. WALTER KEMPNER.

Geringe gleichzeitige Insulingabe (10 Insulineinheiten Merck) bewirkte eine vorübergehende Blutzuckersenkung nach 60—120 Minuten; Höhe und Dauer der Hyperglykämie waren aber nicht vermindert. Nach großer Insulingabe (50 Insulineinheiten) war die Hyperglykämie zwar von kürzerer, aber noch beträchtlicher Dauer. Die Kurve entspricht dem Verlauf der Insulinglykosebelastung beim Phlorhizinhungertier: langsamer Anstieg und verzögerter Abfall (beim Normalhund und Hungerinsulinhund: rascher Anstieg und rascher Abfall).

| Datum und Zeit | Blutzucker in mg% | | Datum und Zeit | Blutzucker in mg% | |
|---------------------|-------------------|------------------|---------------------|-------------------|--------------------------------|
| 8. XI. 1926 | | 20 Std. nüchtern | 11 ^h 35' | 230 | |
| 9 ^h 05' | 89 | | 11 ^h 57' | 249 | |
| 9 ^h 07' | | 100 g Glykose | 12 ^h 27' | 218 | |
| 9 ^h 08' | | 10 Einh. Insulin | 12 ^h 57' | 181 | |
| 9 ^h 22' | 172 | | 1 ^h 45' | 156 | |
| 9 ^h 26' | 202 | | 2 ^h 15' | 102 | |
| 9 ^h 40' | 296 | | 2 ^h 45' | 46 | |
| 9 ^h 53' | 302 | | 3 ^h 17' | 41 | |
| 10 ^h 12' | 220 | | 3 ^h 47' | 42 | |
| 10 ^h 32' | 217 | | 6 ^h 00' | 68 | |
| 10 ^h 52' | 202 | | | | Urin: kein Zucker nachzuweisen |
| 11 ^h 12' | 218 | | | | |

| Datum und Zeit | Blutzucker in mg% | | Datum und Zeit | Blutzucker in mg% | |
|---------------------|-------------------|------------------|---------------------|-------------------|--------------------------------|
| 10. XI. 1926 | | 20 Std. nüchtern | 11 ^h 30' | 185 | |
| 9 ^h 25' | 83 | | 11 ^h 56' | 176 | |
| 9 ^h 29' | | 50 Einh. Insulin | 12 ^h 18' | 167 | |
| 9 ^h 30' | | 100 g Glykose | 12 ^h 24' | 147 | |
| 9 ^h 45' | 168 | | 12 ^h 54' | 123 | |
| 10 ^h 00' | 222 | | 1 ^h 24' | 64 | |
| 10 ^h 15' | 244 | | 1 ^h 35' | 44 | |
| 10 ^h 30' | 220 | | 2 ^h 20' | 19 | Zittern, Krämpfe |
| 10 ^h 50' | 195 | | | | Urin: kein Zucker nachzuweisen |
| 11 ^h 10' | 183 | | | | |

Die verzögerte Normalisierung des Blutzuckers wird also beim belasteten Hungertier ausgeglichen durch Insulin, beim Phlorhizin- und Eck-Hund nicht, d. h. es scheint hier nicht nur ein Mangel an »Assimilationsfermenten« zu bestehen, sondern eine veränderte Funktion der Leberzellen selbst.

Zusammenfassung.

Bei regelmäßig ernährten Phlorhizin-Tieren (auch beim Eck-Hund): Blutzuckergehalt normal, auch bei maximaler Glykosurie (vermehrte Zuckerbildung und vermehrte Zuckerausscheidung).

Bei Phlorhizin-Hungertieren (am stärksten beim hungernden Eck- und Phosphorhund): Hypoglykämie und verminderte Glykosurie (Überbeanspruchung der geschädigten zuckerbildenden Organe).

Bei Glykosebelastung: Hyperglykämie beim Phlorhizinhund von längerer Dauer als beim Normaltier; bei Hungerhunden kann diese »verzögerte« Belastungshyperglykämie durch Insulin ausgeglichen werden, bei Phlorhizin- und Eck-Hunden nicht (veränderte Kohlehydratfixation der Leber).

Bei maximaler Hypoglykämie: nach Phlorhizin keine Vergiftungszeichen; bei den gleichen Tieren bei gleichem Blutzuckergehalt nach Insulin schwere Krämpfe (die Insulinintoxikation wohl nicht nur bedingt durch Stärke und Dauer der Hypoglykämie).

Ergebnis: Das Phlorhizin bewirkt nicht nur eine Nieren- und Ausscheidungsglykosurie, sondern eine veränderte Zuckerbildung und Zuckerwertung.

Atmung im Plasma pestkranker Hühner
[Respiration in the Plasma of Chickens with Plague]

Respiration in the Plasma of Chickens with Plague

by Walter Kempner

In response to a suggestion by O. Warburg, Kempner measured the respiration (oxygen consumption) of the plasma of 50 chickens that had been inoculated with plague virus. It proved possible to separate "plague respiration" from respiration of body cells with cyanide or octyl alcohol and to detect plague respiration in the cells of plague animals. If one saturates the erythrocytes of normal chickens with octyl alcohol, for example, respiration disappears; if one saturates erythrocytes of plague chickens with octyl alcohol, respiration does not disappear, but plague respiration remains.

"Plague respiration" differs in another regard also from previously known respiration, with regard to both cells and cell extracts. In the plasma of plague chickens there is a special kind of respiration, which is either the metabolism of the disease agent or metabolism due to plague effects.

*Sonderdruck aus Klinische Wochenschrift 1927
Jahrg. 6, Nr. 50, S. 2386 (Verlag von Julius Springer, Berlin W 9)*

ATMUNG IM PLASMA PESTKRANKER HÜHNER.

Von

WALTER KEMPNER.

Es liegt nahe, das Problem der invisiblen Krankheitserreger mit den neuen zellphysiologischen Methoden anzugreifen. Ich habe auf Vorschlag von O. WARBURG untersucht, ob es möglich ist, einen Stoffwechsel des Erregers der Hühnerpest nachzuweisen und zu messen.

Plasma normaler Hühner, aus dem die Blutzellen herauszentrifugiert sind, atmet nicht. Ich habe gefunden, daß Plasma pestkranker Hühner atmet.

Das Virus wurde in den Brustmuskel geimpft, in Dosen, die den Tod nach etwa 24 Stunden bewirkten. Das Blut wurde in der Agonie steril entnommen, die Gerinnung durch Heparin verhindert, zentrifugiert, durch Impfen in Nährböden auf Bakterien, durch Impfen in Hühner auf Virulenz geprüft. Der Stoffwechsel im Plasma wurde manometrisch untersucht und hierbei beispielsweise folgendes gefunden:

Tabelle 1. *Atmung von Hühnerpestplasma bei 42°.*

| | Sauerstoffverbrauch (cmm) in 6 ccm Blutplasma beim | |
|------------|--|---------------|
| | Pesthuhn | gesunden Huhn |
| 1. Stunde: | 29 | 0 |
| 2. Stunde: | 20 | 0 |
| 3. Stunde: | 17 | 0 |

Dies bedeutet: 6 ccm Pest-Plasma verbrauchen ebensoviel Sauerstoff wie 3000 Millionen Hühnererythrocyten.

Im ganzen habe ich 50 pestkranke Hühner untersucht. In jedem stark virulenten Plasma fand ich Atmung, niemals aber in normalem Plasma, das unter gleichen Bedingungen (Erstickungsplasma) gewonnen war.

Die Atmung im Plasma pestkranker Hühner ist gegen Blausäure viel unempfindlicher als die Atmung der Körperzellen. Sie wird ferner, anders als die Atmung der Körperzellen und Bakterien, durch Octylalkohol (gesättigte Lösung) nicht gehemmt. Daher kann man mit Blausäure oder Octylalkohol „Pestatmung“ von der Atmung der Körperzellen trennen und die Pestatmung auch in Zellen pestkranker Tiere nachweisen. Sättigt man z. B. Erythrocyten normaler Hühner mit Octylalkohol, so verschwindet die Atmung, sättigt man Erythrocyten pestkranker Hühner mit Octylalkohol, so verschwindet die Atmung nicht, sondern es bleibt die Pestatmung übrig.

— 2 —

Tabelle 2. 42°.

| | Sauerstoffverbrauch (cmm) in 100 mg Blutkörperchen (Trockengewicht) in einer Stunde beim | |
|-------------------|---|---------------|
| | Pesthuhn | gesunden Huhn |
| Ohne Octylalkohol | 80 | 39 |
| Mit Octylalkohol | 35 | 0 |

Auch in anderer Hinsicht unterscheidet sich die „Pest-atmung“ von der bisher bekannten Atmung, sowohl von der Atmung von Zellen als auch von der Atmung von Zellextrakten. Im Plasma pestkranker Hühner ist also eine besondere Art von Atmung, die entweder der Stoffwechsel des Pesterregers ist, oder Stoffwechsel, der unter seiner Wirkung entsteht.

(Für Rat und Hilfe, besonders bei den bakteriologischen Untersuchungen, sei auch an dieser Stelle Frau Professor RABINOWITSCH-KEMPNER herzlichst gedankt.) (Aus dem Kaiser Wilhelm-Institut für Biologie, Berlin-Dahlem.)

Stoffwechsel der Entzündung
[Metabolism of Inflammation]

Metabolism of Inflammation

by Walter Kempner and Ernst Peschel

Pathological anatomy describes inflammation as the sum of cell and tissue changes—e.g., irritation, exudation, migration—with the end result of tumor, edema, degeneration, necrosis. Pathological physiology asks, what happens as a result of the cell and tissue changes? What processes lead from cell migration to tumefaction or necrosis? What are the specific reactions of inflammation? In order to attack these questions experimentally, it seemed appropriate to study metabolism in an area of inflammation; an inflammatory blister provided a suitable environment.

The metabolism of inflammation is centered on the metabolism of the inflammatory cell. We focused our investigation on this process and on the changes that appear in the composition of the inflammatory fluid.

Measurements of various cells showed that aerobic glycolysis is highest in the most damaged white blood cells and is lacking in the not yet "aged" white blood cells, i.e. leukemic leucocytes. This proves that the aerobic glycolysis of white blood cells in the blood and exudate is directly related to the process of their dying in the circulation or in the exudate.

It seemed likely that the substances, which developed or changed in their proportional amounts within the blister as a result of cell metabolism, would immediately return to equilibrium through exchange with tissue fluid and capillary blood. Our experiments, however, showed that such an equilibrium between inflammatory fluid and blood or tissue fluid actually does not exist; instead, within a sealed-off area of inflammation, there is a very reduced exchange of solids in solution or gases. If the exchange between normal and inflamed tissue is blocked, then the metabolism of the inflammatory cells would produce the following results:

- (1) Since inflammatory cells take up oxygen and give off carbonic acid, the oxygen tension in the inflammatory fluid will decrease and the carbonic acid content will increase.
- (2) Since the inflammatory cells respire and split sugar, the sugar content in the inflammatory area must decrease.
- (3) Since the inflammatory cells, by the splitting of sugar, form lactic acid, the lactic acid content in the inflammatory fluid must increase.
- (4) Since the lactic acid combines with the sodium bicarbonate in the inflammatory fluid to form sodium lactate, giving off carbonic acid, there must be a decrease in bicarbonate in inflammatory fluid.

- (5) Corresponding to the decrease in bicarbonate and the increase in carbonic acid, hydrogen ion concentration in the inflammatory fluid must rise.

All of these interrelated reactions would thus be a function of the number of inflammatory cells and the duration of their metabolism. We therefore examined the sugar, lactic acid, bicarbonate, and oxygen content of the blister fluid after various periods of inflammation. Our measurements showed that the above changes did occur.

Based on our findings in the inflammatory skin blister—and assuming that the reactions of inflammation are always the same and that only the effects of these reactions differ in different organs—the following paragraphs describe what occurs generally during the course of an inflammation.

In response to some kind of stimulus, exudation and immigration of white cells occur. The chemical composition of the exudative fluid in the exudate is the same as that of serum. Once the exudate and the inflammatory cells are present, a specific life process, separate from that of normal tissue, begins within the inflammatory area; in its center is the metabolism of the inflammatory cell.

Oxidation and fermentation by the inflammatory cells bring about an acidification of the area of inflammation and a depletion of oxygen and energy-supplying substances in the area of inflammation. The formation of acid and lack of energy-supplying substances lead to the injury or destruction of the inflamed tissue, with swelling, degeneration, and necrosis.

The reactions of inflammation have destructive action not only on the cells of inflammation but—whenever the inflammation is not, as in our experiment, sterile—also on the cells not belonging to the body through which most inflammation is brought about: bacteria.

These cells, as they are isolated and cut off by the leukocytes, are even less able to gain the energy necessary for life than the inflammatory cells which are closely adjacent to healthy tissue or capillary blood; for the same reason they are less easily affected by the acid formed. If the inflammation is advanced, i.e. if, in the area of inflammation, the sugar is used up and the inflow of oxygen minimal, then the bacteria can neither glycolize nor oxidize sugar. When considerable additional oxygen consumption of the bacteria is added to the oxygen consumption of the inflammatory cells while the inflow of oxygen remains at a constant low level, it is possible that anaerobiasis can develop, cutting off the oxidation of protein and fat—that is, all energy supplying reactions.

This could explain the poorer healing capacity of diabetics with bacterial infections. Whereas after 2-3 days the sugar in the inflammatory area in non-diabetic patients has been used up and is unavailable as an energy source for the bacteria, in diabetic patients at this time the sugar content is still considerable and gives the bacteria ample possibilities for living.

In some illnesses, inflammation has a predominantly healing effect through the destruction of bacteria; in others, inflammation inflicts harm through the destruction of body cells. One has also to consider the healing or harmful effects on the entire organism arising from the site of inflammation. Accordingly, one will try to increase or decrease the inflammatory reaction, depending on whether the danger of tissue destruction or of bacterial spread is greater, and on whether the inflammation represents a greater possibility of danger or healing for the entire organism.

ZEITSCHRIFT FÜR KLINISCHE MEDIZIN

HERAUSGEGEBEN VON

G. VON BERGMANN
BERLIN

H. EPPINGER
KÖLN

A. GOLDSCHIEDER
BERLIN

W. HIS
BERLIN

G. KLEMPERER
BERLIN

F. KRAUS
BERLIN

L. LICHTWITZ
ALTONA

C. VON NOORDEN
WIEN

N. ORTNER
WIEN

A. SCHITTENHELM
KIEL

R. STÄHELIN
BASEL

W. STEPP
BRESLAU

S. J. THANNDAU
FREIBURG I. BR.

F. VOLHARD
FRANKFURT A. M.

REDIGIERT VON

W. HIS UND G. VON BERGMANN

Sonderabdruck aus 114. Band. 4. und 5. Heft

**Walter Kempner und Ernst Peschel:
Stoffwechsel der Entzündung**



BERLIN
VERLAG VON JULIUS SPRINGER

1930

Z.klin.
Med.

(Aus der II. Medizinischen Klinik der Charité, Berlin.
Direktor: Prof. G. v. Bergmann.)

Stoffwechsel der Entzündung*.

Von
Walter Kempner und Ernst Peschel.

Mit 2 Textabbildungen.

(Eingegangen am 26. Juli 1930.)

Die pathologische Anatomie beschreibt die Entzündung als eine Summe von Zell- und Gewebsveränderungen, von Alteration, Exsudation, Emigration usw. mit den Endzuständen von Schwellung, Quellung, Degeneration, Nekrose. Die pathologische Physiologie fragt: Was bewirken diese Zell- und Gewebsveränderungen, welche Prozesse führen beispielsweise von einer Zellemigration zu einer Schwellung oder Nekrose, welches sind die spezifischen Reaktionen der Entzündung?

Um diese Frage experimentell anzugehen, lag es nahe, den Stoffwechsel im Entzündungsbereich zu untersuchen. Als Versuchsobjekt erschien die entzündliche Hautblase geeignet. Sie ist eine Entzündung, die leicht hervorgerufen und untersucht werden kann und ohne komplizierende Nebenreaktionen, wie sie z. B. durch die Anwesenheit von Bakterien oder Tumoren bedingt sind, verläuft¹.

Die Blasenmethode wurde zuerst von Gänslen² zur Prüfung der Capillarfunktion und zur chemischen Analyse der Gewebsflüssigkeit empfohlen, in der Annahme, daß der Blaseninhalt im wesentlichen übereinstimme mit dem Gewebssaft, und daß Abweichungen von gleichzeitig gemessenen Blutwerten auf entsprechenden Veränderungen der Gewebsflüssigkeit beruhen.

Von anderem Gesichtspunkt ausgehend untersuchte Kauffmann³ die örtliche Blasenbildung als Ausdruck allergischer Zustände bei verschiedenen Krankheiten, die Beziehungen der Entzündungsfähigkeit zur herrschenden Krankheitslage.

In ähnlichem Sinn wie Kauffmann betrachten wir bei unseren Untersuchungen die Hautblase lediglich als eine Form der örtlichen Entzündung, als ein einfaches Modell für Entzündungen überhaupt. Die Hautblasen wurden hervorgerufen durch Cantharidenpflaster. Irgendwelche Komplikationen ergaben sich durch das Anlegen der Pflaster in keinem Falle.

* Ausgeführt mit Unterstützung der Notgemeinschaft Deutscher Wissenschaft.

Im Mittelpunkt des Stoffwechsels der Entzündung steht der Stoffwechsel der entzündlichen Zellen, mit dessen Untersuchung wir beginnen. Es folgt die Beschreibung der Veränderungen, die sich in der Zusammensetzung der Entzündungsflüssigkeit zeigen.

A. Stoffwechsel der entzündlichen Zellen.

Nach *Kauffmanns* Untersuchungen besteht der Zellgehalt des Blaseninhalts aus neutro-, baso- und eosinophilen Leukocyten und mononucleären „Lymphohistiocyten“. Die Zusammensetzung im einzelnen, speziell der prozentuale Anteil polynucleärer und mononucleärer Elemente, wechselt. Sehr schwankend sind auch die absoluten Mengen der entzündlichen Zellen in der Entzündungsflüssigkeit bei verschiedenen Patienten.

Der Stoffwechsel weißer Blutzellen wurde zuerst von *Grafe*⁴ untersucht. *Grafe* fand, daß die weißen Blutkörperchen einen erheblichen Oxydationsstoffwechsel haben. Die glykolytische Wirksamkeit weißer Blutzellen wurde erstmalig von *Levene* und *Meyer*⁵ festgestellt. *Bakker*⁶ untersuchte Atmung und Milchsäurebildung von Kaninchenexsudatleukocyten und fand eine große aerobe Glykolyse neben einer geringen Atmung. Er folgerte aus dem Verhältnis von Atmung zu Gärung einen Carcinomstoffwechsel der Leukocyten.

Im Warburgsehen Institut haben *Fleischmann* und *Kubowitz*⁷ den Stoffwechsel von Gänseblutleukocyten und Kaninchenexsudatleukocyten, *Fujita*⁸ den Stoffwechsel von Rattenknochenmarkszellen und -blutleukocyten gemessen.

*Schlossmann*⁹ untersuchte 1 Fall von lymphatischer Leukämie und fand die aerobe Glykolyse leukämischer Lymphocyten gleich 0. Wir¹⁰ untersuchten bei 4 Patienten mit lymphatischer Leukämie den Stoffwechsel leukämischer Lymphocyten und fanden ebenfalls die aerobe Glykolyse gleich 0.

Die zahlenmäßigen Ergebnisse dieser Arbeiten sind in Tab. 1 zusammengestellt.

Tabelle 1.

| Untersucher | Art der Leukocyten | Q _{O₂} Atmung | Q _M ^{O₂} Aerobe Glykolyse | Q _M ^{N₂} Anaerobe Glykolyse |
|---|--------------------------|--------------------------------------|--|--|
| <i>Bakker</i> | Kaninchenexsudatleukoc. | — 0,4 | + 6,0 | |
| <i>Fleischmann</i> und <i>Kubowitz</i> | Gänseblutleukocyten | — 4,9 | + 1,8 | + 11,6 |
| <i>Fleischmann</i> und <i>Kubowitz</i> | Kaninchenexsudatleukoc. | — 4,5 | + 14,0 | + 23,3 |
| <i>Fujita</i> | Rattenknochenmarkszellen | — 9,8 | + 3,7 | + 21,0 |
| <i>Fujita</i> | Rattenblutleukocyten | — 9,2 | + 2,6 | + 20,2 |
| <i>Schlossmann</i> | Leukämische Lymphocyt. | — 12,0 | 0 | + 21,9 |
| <i>Peschel</i> | Leukämische Lymphocyt. | — 5,8 | 0 | + 11,1 |

Daß die aerobe Glykolyse bei den am meisten geschädigten weißen Blutkörperchen, den Exsudatleukocyten, am größten ist und bei noch nicht „gealterten“ weißen Blutzellen, den leukämischen Leukocyten fehlt, beweist, daß die aerobe Glykolyse der Blut- und Exsudatleukocyten bedingt ist durch ihr Absterben im Kreislauf oder Exsudat. Denn bekanntlich kann durch verschiedene Schädigungen, die zum Absterben der Zellen führen, eine aerobe Glykolyse entstehen — bei empfindlichen Organen sogar schon durch Aufenthalt des Gewebes in Ringerlösung anstatt in arteigenem Serum¹¹. Eine Übereinstimmung mit dem Stoffwechsel des Carcinoms¹¹ besteht also nicht oder nur scheinbar, indem die Leukocyten innerhalb des Körpers — in gleicher Weise wie andere Gewebe außerhalb des Körpers — bei ihrem *Absterben* aerob Zucker in Milchsäure spalten, während das Carcinom durch seine aerobe Zuckerspaltung *lebt*.

Wir haben den Stoffwechsel der Exsudatzellen der Hautblase bei verschiedenen Patienten nach einer Entzündungszeit von 19–44 Stunden bestimmt. Die Blase wurde steril punktiert, das Punktat bei 37,5° C mit 5% CO₂/O₂ gesättigt und der Stoffwechsel der entzündlichen Zellen manometrisch nach der von Warburg angegebenen Methode¹¹ in der Blasenflüssigkeit gemessen (Tab. 2).

Tabelle 2. Stoffwechsel der entzündlichen Zellen in der Hautblase.

| Nr. | Dauer der Pflaster- einwirkung in Stunden | Q _{O₂} (Atmung) | Q _M ^{O₂} (Aerobe Glykolyse) |
|------------------|--|--|---|
| 1 | 22 | — 43,5 | ÷ 29,5 |
| 2 | 20 | — 20,8 | + 12,4 |
| 3 | 21 | — 16,9 | + 21,9 |
| 4 | 24 | — 27,6 | + 18,2 |
| 5 | 19 | — 8,3 | + 13,4 |
| 6 | 21 | — 42,9 | ÷ 47,1 |
| 7 | 20 | — 12,8 | + 3,9 |
| 8 | 22 | — 47,0 | + 26,0 |
| 9 | 22 | — 28,8 | + 8,7 |
| 10 | 20 | — 13,4 | + 10,3 |
| 11 | 21 | — 14,0 | + 18,4 |
| 12 | 24 | — 4,0 | + 12,5 |
| 13 | 44 | — 18,5 | + 12,9 |
| 14 | 19 | — 20,6 | + 20,0 |
| Mittel | | — 22,8 | ÷ 16,8 |

Das Trockengewicht der Zellen wurde bestimmt nach Zentrifugieren in einem spitz auslaufenden Röhrchen von ungefähr 5 ccm Inhalt, wovon der weitere Teil 4,5 ccm, der verjüngte 0,5 ccm enthielt (Abb. 1). Die Flüssigkeit wurde mit einer Capillare abgesaugt, das Zentrifugat bei

100° C getrocknet. Für die Wägung (Mikrowaage) wurde das untere, das Zentrifugat enthaltende Ende des Röhrchens abgefeilt, gewogen und nach Reinigung das Leergewicht des Glases bestimmt.

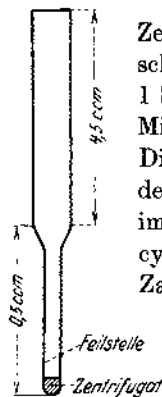


Abb. 1.

Wie sich aus Tab. 2 ergibt, besitzen die entzündlichen Zellen eine große Atmung und aerobe Glykolyse: im Durchschnitt veratmet 1 mg Leukocyten (Trockensubstanz) in 1 Stunde 22,8 cmm O_2 und bildet ungefähr 16,8 cmm Milchsäure — $CO_2 = 16,8 \cdot 0,004 \text{ mg} = 0,07 \text{ mg}$ Milchsäure. Die Atmungs- und Glykolysewerte der Leukocyten verschiedener Blasen schwanken beträchtlich und sind sehr hoch im Vergleich zu den von anderen Autoren für Tierleukocyten und von uns für leukämische Leukocyten gefundenen Zahlen (s. Tab. 1). Doch handelt es sich, wie oben gesagt, bei den Blasenleukocyten, wie bei den übrigen Exsudatleukocyten, um einen Schädigungsstoffwechsel, also nicht um einen stationären Stoffwechsel, so daß anzunehmen ist, daß die verschiedenen Stoffwechselzahlen durch verschiedene Grade der Schädigung bedingt sind.

Die absoluten Zahlen der Atmung und aeroben Glykolyse wären an sich überhaupt uninteressant, denn für die Biologie der weißen Blutzellen ergibt sich aus ihnen nichts Charakteristisches. Wichtig sind sie nur für die Frage: Welche Veränderungen werden durch den Stoffwechsel der entzündlichen Zellen im entzündeten Gewebe hervorgerufen, welche spezifischen Reaktionen bewirken die entzündlichen Zellen am Ort der Entzündung?

B. Veränderungen der Entzündungsflüssigkeit.

Es war wahrscheinlich, daß die Stoffe, die durch den Zellstoffwechsel im Innern der Blase entstehen oder in ihrem Mengenverhältnis geändert werden, sich durch den steten Austausch mit dem Gewebssaft und den Blutcapillaren sofort wieder ausgleichen. Auf dieser Annahme beruhen sämtliche Untersuchungen, die die Entzündungsflüssigkeit mit der Gewebsflüssigkeit gleichsetzen. Unsere Untersuchungen aber hatten das Ergebnis, daß ein solcher Ausgleich zwischen Entzündungsflüssigkeit und Blut oder Gewebssaft praktisch nicht besteht, sondern daß es sich handelt um einen abgeschlossenen Entzündungsraum mit sehr vermindertem Austausch an gelösten festen Substanzen und Gasen.

Ist also der Austausch zwischen normalem und entzündetem Gewebe unterbrochen, so ergibt sich als Folge des Stoffwechsels der entzündlichen Zellen:

I. Da die entzündlichen Zellen Sauerstoff aufnehmen und Kohlensäure abgeben, muß der Sauerstoffgehalt in der Entzündungsflüssigkeit abnehmen und der Kohlensäuregehalt zunehmen.

II. Da Zucker von den entzündlichen Zellen veratmet und gespalten wird, muß der Zuckergehalt der Entzündungsflüssigkeit abnehmen.

III. Da von den entzündlichen Zellen entsprechend der Zuckerspaltung Milchsäure gebildet wird, muß der Milchsäuregehalt der Entzündungsflüssigkeit zunehmen.

IV. Da sich die Milchsäure mit dem Natriumbicarbonat der Entzündungsflüssigkeit unter Abgabe von Kohlensäure zu Natriumlactat verbindet, muß der Bicarbonatgehalt der Entzündungsflüssigkeit abnehmen.

V. Entsprechend der Bicarbonatabnahme und der Kohlensäurezunahme muß die Wasserstoffionenkonzentration der Entzündungsflüssigkeit steigen.

Diese sämtlichen aneinander gekoppelten Reaktionen wären dann eine Funktion der Menge der entzündlichen Zellen und der Dauer ihres Stoffwechsels. Deshalb haben wir nach verschieden langer Dauer der Entzündung den Gehalt der Entzündungsflüssigkeit an Zucker, Milchsäure, Bicarbonat, Sauerstoff untersucht.

Es ist wahrscheinlich, daß die Werte im Blaseninnern ursprünglich mit den Serumwerten übereinstimmen. Direkt beweisbar ist es kaum; denn zu der Zeit, wo eine untersuchbare Flüssigkeitsmenge gewonnen werden kann, ist auch der Entzündungsvorgang so weit vorgeschritten, daß die Diffusionsverhältnisse verschlechtert sind und die geschilderten Umsetzungen bereits begonnen haben.

I. Zuckergehalt der Entzündungsflüssigkeit.

Um den Zuckergehalt der Entzündungsflüssigkeit nach verschieden langer Dauer der Entzündung zu untersuchen, wurden bei denselben Patienten an beiden Oberschenkeln 2—3 Blasen angelegt und nach verschieden langer Dauer der Pflastereinwirkung der Zuckergehalt der einzelnen Blasen (nach *Hagedorn-Jensen*) untersucht. Gleichzeitig wurde der Zuckergehalt im Blute bestimmt (Tab. 3).

Tabelle 3. *Zuckergehalt der Entzündungsflüssigkeit bei Patienten mit normalem Blutzuckergehalt.*

| Blutzucker in mg% | Blasenzucker in mg% | | |
|----------------------|---------------------|--------------------|--------------------|
| | Nach 14—24 Std. | Nach 25—59 Std. | Nach 60—98 Std. |
| 135 | — | 38 | 6 |
| 142 | — | 68 | — |
| 71 | 63 | 20 | — |
| 123 | — | — | 12 |
| 89 | 46 | 19 | 6 |
| 107 | — | 10 | — |
| 75 | 43 | 12 | 14 |
| 96 | — | — | 7 |
| 85 | 64 | 14 | 15 |

Wie sich aus Tab. 3 ergibt, nimmt mit der Dauer der Entzündung der Zuckergehalt in der Entzündungsflüssigkeit ab. Auch bei sehr kurzer Entzündungsdauer (14–24 Stunden) ist der Zuckergehalt der Entzündungsflüssigkeit gegenüber dem Blutzuckergehalt bereits vermindert. Bei Patienten mit nicht erhöhtem Blutzuckergehalt sinkt der Blasen Zucker nach einer Entzündungszeit von 60–93 Stunden auf Werte von 15–6 mg%, d. h. eine Zuckerkonzentration, bei der wahrscheinlich die entzündlichen Zellen aufhören, den Zucker zu oxydieren oder zu spalten. (Wie Warburg fand, sinkt die Glykolyse der Carcinomzelle mit abnehmender Zuckerkonzentration: z. B. bei Abnahme der Zuckerkonzentration von 80 auf 20 mg% ein Sinken der Milchsäurebildung auf die Hälfte.)

Bei Patienten mit Diabetes mellitus war der Blasen Zucker bei länger dauernder Entzündung ebenfalls gegenüber dem Blutzucker (in der Tabelle sind die Maximal- und Minimalzahlen der während der Pflasterein-

Tabelle 4. Zuckergehalt der Entzündungsflüssigkeit bei Patienten mit Diabetes mellitus.

| Blutzucker in mg% | Blasen Zucker in mg% nach 60–93 Std. |
|-------------------|---|
| 224 | 161 |
| 222/178 | 98 |
| 313/260 | 91 |
| 210 | 123 |
| 232/227 | 98 |

wirkung täglich nüchtern gemessenen Blutzuckerwerte angegeben) beträchtlich vermindert (Tab. 4), doch wurden die Minimalwerte normaler Patienten niemals erreicht. Dies ist aus den in den folgenden Abschnitten beschriebenen Veränderungen der Ent-

zündungsflüssigkeit verständlich: Nach einer Entzündungsdauer von 70–100 Stunden ist durch die Zuckerspaltung der Leukocyten bereits so viel Milchsäure gebildet und Bicarbonat ausgetrieben, daß aus diesem Grunde, Änderung der Wasserstoffionen- und Bicarbonatkonzentration, die Leukocyten aufgehört haben, den Zucker zu verbrauchen.

Gänsslen², der den Zuckergehalt der Blase nur nach kurzer Entzündungsdauer als Test für den Zuckergehalt des Gewebes untersuchte, fand bei Patienten mit fieberhaften Erkrankungen und Morbus Basedow in der Blase einen niedrigeren Zuckergehalt als im Blute. Er folgerte, daß das Gewebe unter pathologischen Bedingungen einen niedrigeren Zuckergehalt habe als das Blut. Uns erscheint der verminderte Zuckergehalt in der Blase bedingt durch den Stoffwechsel der entzündlichen Zellen.

Um auch bei einer erhöhten Zuckerkonzentration des Gewebes die Verminderung des Zustroms ins Entzündungsgebiet nachzuweisen, wurden Patienten, bei denen Blasen verschiedener Entzündungsdauer bestanden, mit einer größeren Zuckermenge peroral belastet. Von je 2 Blasen gleicher Entzündungsdauer wurde die eine unmittelbar vor,

Stoffwechsel der Entzündung.

445

die andere 3—4 Stunden nach der Belastung auf ihren Zuckergehalt untersucht. Es ergab sich: Bei kurzer Entzündungsdauer, wie auch *Gänsslen* fand, besteht ein Zustrom des Zuckers vom normalen ins entzündliche Gewebe. Nach längerer Einwirkung der Entzündung (64 bis 93 Stunden) ist ein vermehrter Zuckergehalt bei Zuckerbelastung nicht mehr nachweisbar, ein Zustrom des Zuckers aus dem normalen ins entzündliche Gewebe besteht nicht mehr (Tab. 5).

Tabelle 5. Zuckergehalt der Entzündungsflüssigkeit nach peroraler Zuckerbelastung.

| | Zuckergehalt in mg% 5 Minuten vor Zuckerbelastung | | Zuckergehalt in mg% 4 Stunden nach Zuckerbelastung |
|--------------------|---|--------------------|--|
| Blut. | 89 | Blut. | 125 |
| Blase v. 19 Std. . | 46 | Blase v. 23 Std. . | 72 |
| Blase v. 46 Std. . | 19 | Blase v. 50 Std. . | 44 |
| Blase v. 93 Std. . | 6 | Blase v. 97 Std. . | 6 |
| | Zuckergehalt in mg% 5 Minuten vor Zuckerbelastung | | Zuckergehalt in mg% 8 Stunden nach Zuckerbelastung |
| Blut. | 110 | Blut. | 88 |
| Blase v. 16 Std. . | 70 | Blase v. 19 Std. . | 101 |
| Blase v. 64 Std. . | 27 | Blase v. 67 Std. . | 5 |

II. Milchsäuregehalt der Entzündungsflüssigkeit.

Die Messungen des Stoffwechsels der entzündlichen Zellen ergaben: 1 mg (Trockensubstanz) der entzündlichen Zellen (nach 16—24stündiger Entzündungsdauer) bildet bei der Zuckerspaltung unter aeroben Bedingungen in 1 Stunde $16,8 \cdot 0,004 \text{ mg} = 0,0672 \text{ mg}$ Milchsäure. Nach 40stündiger Pflastereinwirkung wären also bei einem ungefähren Beginn des Zellstoffwechsels in der Blase nach 10stündiger Pflastereinwirkung $30 \cdot 0,067 = 2,0 \text{ mg}$ Milchsäure von 1 mg entzündlicher Zellen gebildet. Sind in 1 ccm Blaseninhalt durchschnittlich 0,75 mg (Trockensubstanz) entzündlicher Zellen, so müßte sich bei einem vollständigen Abschluß der Entzündungsblase ein Milchsäuregehalt von $150 \text{ mg\%} + 10 \text{ mg\%}$ (dem anfänglichen Milchsäuregehalt der zellfreien Flüssigkeit, entsprechend dem Milchsäuregehalt des Serums) = 160 mg\% ergeben, wenn Zuckergehalt, Bicarbonatkonzentration und p_H des Exsudats konstant blieben. Dies ist aber, wie in anderen Abschnitten beschrieben, nicht der Fall. Entsprechend der abnehmenden Zuckerkonzentration nimmt mit fortschreitender Entzündung auch die Glykolyse ab, bei den minimalen Zuckerkonzentrationen von 6—15 mg% ist auch die Glykolyse minimal, und die Milchsäurekonzentration oberhalb einer bestimmten Entzündungszeit bliebe relativ konstant. Der Milchsäuregehalt der Ent-

zündungsflüssigkeit wäre also geringer als die aus dem Zellstoffwechsel *in vitro* errechnete Milchsäuremenge: in der ersten Phase der Entzündung, *vor* dem Abschluß des Entzündungsraumes, infolge des Übertritts der Entzündungsmilchsäure ins normale Gewebe, in der zweiten Phase, *nach* Abschluß des Entzündungsraumes, infolge der für die Zuckerspaltung ungünstigen Zucker-, Bicarbonat- und Wasserstoffionenkonzentration.

*Scheller*¹² fand in sterilen lympho- und leukocyitären Pleuraexsudaten einen Milchsäuregehalt von 17–32 mg %, in einem Hautblasenexsudat (wahrscheinlich nach minimaler Entzündungsdauer) einen Milchsäuregehalt von 10 mg % bei einem Zuckergehalt von 90 mg %.

Kugelman hat (in einer noch unveröffentlichten Arbeit) den Milchsäuregehalt der Entzündungsblase bei Patienten mit verschiedenen Krankheiten nach 12–24stündiger Pflastereinwirkung untersucht. Er fand bei den meisten Patienten den Milchsäuregehalt der Blase beträchtlich höher als den des Blutes. Wir haben gemeinsam mit *Kugelman* nach der gleichen Anordnung wie bei Bestimmung der übrigen Substanzen den Milchsäuregehalt der Blase nach verschieden langer Entzündungsdauer (nach *Mendel-Goldscheider* oder *Fürth-Charnass-Clausen*) bestimmt (Tab. 6).

Tabelle 6. Milchsäuregehalt der Entzündungsflüssigkeit.

| Milchsäuregehalt des Blutes in mg% | Milchsäuregehalt der Blase in mg% | | |
|------------------------------------|-----------------------------------|-----------------|-----------------|
| | Nach 14–24 Std. | Nach 25–59 Std. | Nach 60–90 Std. |
| 9 | 31 | 50 | 105 |
| 8 | 31 | 43 | 125 |
| 10 | — | — | 85 |
| — | — | 14 | — |
| 9 | 36 | 72 | — |
| — | — | — | 104 |
| — | — | 105 | 125 |
| — | — | 59 | — |
| — | — | — | 112 |
| 13 | 46 | 86 | 95 |

Es ergab sich: Mit fortschreitender Entzündungsdauer bis zu ungefähr 60 Stunden nimmt der Gehalt der Blasenflüssigkeit an Milchsäure zu und bleibt dann relativ konstant. Wir fanden Maximalwerte von 125 mg %, beträchtliche Unterschiede des Milchsäuregehaltes in Blasen gleicher Entzündungsdauer bei verschiedenen Patienten, z. B. nach 41stündiger Entzündungsdauer Werte von 43, 72, 105 mg %. Bei einer 59jährigen Patientin mit Asthma bronchiale fand sich noch nach 62stündiger Pflastereinwirkung bei sehr großer Exsudat- und minimaler

Zellmenge ein Milchsäuregehalt von 14 mg%, entsprechend einem Zuckergehalt von 80 mg%, einem Bicarbonatgehalt von 515 cmm und einem p_H von 7,35, d. h. infolge des Fehlens der entzündlichen Zellen waren die physikalisch-chemischen Veränderungen im Entzündungsgebiet minimal.

Die absoluten Milchsäuremengen, die in der Blasenflüssigkeit entstehen, wären relativ unwichtig, vorausgesetzt, daß genügend Natriumbicarbonat vorhanden wäre oder entsprechend der Milchsäurebildung zuströmt, so daß die entstehende Milchsäure sogleich wieder zu neutralem Natriumlactat gebunden würde. Findet dieser Zustrom des Natriumbicarbonat nicht statt, wird für jedes gebildete Molekül Milchsäure 1 Molekül Bicarbonat aus der Entzündungsflüssigkeit verschwinden und also bei gleichbleibender (oder sogar zunehmender) Kohlensäurekonzentration die Wasserstoffionenkonzentration der Entzündungsflüssigkeit steigen.

III. Bicarbonatgehalt der Entzündungsflüssigkeit.

Der Bicarbonatgehalt der Blasenflüssigkeit wurde nach der von Warburg angegebenen Methode manometrisch bestimmt. Wie bei der Zucker- und Milchsäurebestimmung wurden bei den gleichen Patienten Blasen verschiedener Entzündungsdauer gleichzeitig punktiert und der Bicarbonatgehalt der Blasen und des Blutserums gemessen (Tab. 7).

Es fand sich entsprechend der Zuckerspaltung und Milchsäurebildung eine mit fortschreitender Entzündung fortschreitende Abnahme des Bicarbonats. Das Sinken des p_H (von Dr. Mislowitz freundlichst nach der Methode mit Chinhydron bestimmt) ist natürlich nicht nur durch die Bicarbonatabnahme, sondern auch durch die jeweils verschiedene Zunahme des Kohlensäuregehalts bedingt.

Schade¹³ hat als erster Vorgänge der Entzündung im Gegensatz zur morphologisch-anatomischen Betrachtungsweise physikalisch-chemisch untersucht und dabei auch die Zunahme der Wasserstoffionenkonzentration in entzündlichen Flüssigkeiten und Eiterungen gefunden.

Die Veränderung des Milchsäure- und Bicarbonatgehalts der entzündlichen Flüssigkeit durch den Stoffwechsel der entzündlichen Zellen und das Fehlen dieser Veränderungen beim Fehlen der entzündlichen Zellen in der Entzündungsflüssigkeit macht es sicher, daß die Änderung der Wasserstoffionenkonzentration bei Entzündungsprozessen wesentlich bedingt ist durch die Milchsäurebildung der entzündlichen Zellen, nicht durch den Zerfall des entzündlichen Gewebes.

Durch die Abnahme des Bicarbonatgehalts, der „Alkalireserve“ in der Blasenflüssigkeit, besitzt man einen Maßstab, bis zu welchem Grad

448

W. Kempner und E. Peschel:

Tabelle 7. Zucker-, Milchsäure- und Bicarbonatgehalt in der Entzündungsflüssigkeit.

| Nr. | Untersuchungsmaterial | Zucker mg% | Milchsäure mg% | Bicarbonat cmmin 1ccm | p _H |
|-----|-------------------------------|---------------|-------------------|--------------------------|----------------|
| 1 | Serum | 135 | 9 | 537 | |
| | Blase von { 20 Std. | — | 31 | 485 | |
| | Blase von { 39 Std. | 38 | 50 | 412 | |
| | Blase von { 63 Std. | 6 | über 100 | 297 | |
| 2 | Serum | 142 | 10 | 526 | 6,29 |
| | Blase von 60 Std. | 68 | 85 | 364 | |
| 3 | Serum | 71 | 9 | 512 | |
| | Blase von { 16 Std. | 63 | 36 | 477 | |
| | Blase von { 24 Std. | 45 | 44 | 423 | |
| | Blase von { 42 Std. | 20 | 72 | 281 | |
| 4 | Serum | — | 8 | 525 | |
| | Blase von { 14 Std. | — | 31 | 499 | |
| | Blase von { 41 Std. | — | 43 | 440 | |
| | Blase von { 60 Std. | — | 73 | 404 | |
| | Blase von { 70 Std. | — | 125 | 199 | |
| 5 | Serum | 123 | — | 610 | 7,03 |
| | Blase von 64 Std. | 12 | über 100 | 351 | |
| 6 | Serum | 107 | — | 545 | |
| | Blase von { 43 Std. | 10 | über 100 | 308 | |
| | Blase von { 64 Std. | — | 84 | 415 | |
| | Blase von { 70 Std. | — | 112 | 338 | |
| | Blase von { 90 Std. | 19 | 125 | 228 | |
| 7 | Serum | 75 | — | 576 | |
| | Blase von { 20 Std. | 64 | — | 569 | |
| | Blase von { 39 Std. | 14 | — | 412 | |
| | Blase von { 63 Std. | 15 | — | 385 | |
| 8 | Serum | — | — | — | 6,87 |
| | Blase von 51 Std. | — | 59 | 360 | |
| 9 | Serum | 75 | 13 | 606 | |
| | Blase von { 23 Std. | 43 | 46 | 535 | |
| | Blase von { 47 Std. | 12 | 86 | 369 | |
| | Blase von { 65 Std. | 14 | 95 | 333 | |

durch den Zellstoffwechsel einerseits und den Abschluß des Entzündungsraumes andererseits die Entzündung vorgeschritten ist. Will man also z. B. die verschiedene Reaktionsfähigkeit auf entzündliche Reize bei verschiedenen Erkrankungen prüfen, so wäre es zweckmäßig, neben der Feststellung der Zellmenge und des Verhältnisses der verschiedenen Zellarten auch den Bicarbonatgehalt der Entzündungsflüssigkeit zu untersuchen (Tab. 8).

Stoffwechsel der Entzündung.

449

Tabelle 8. Bicarbonatgehalt der Entzündungsflüssigkeit bei verschiedenen Erkrankungen.

| Nr. | Erkrankung | Blasenzeit in Stunden | Bicarbonatgehalt (cmm in 1 ccm) | |
|-----|------------------------------------|--------------------------------|---------------------------------|--------------|
| | | | im Serum | in der Blase |
| 1 | Diabetes | 14 | 525 | 499 |
| 2 | Lymphatische Leukämie | 19 | 472 | 453 |
| 3 | Diabetes | 19 ¹ / ₂ | 504 | 476 |
| 4 | Ulcus ventriculi | 19 ¹ / ₂ | 613 | 578 |
| 5 | Diabetes | 19 ¹ / ₂ | 496 | 432 |
| 6 | Diabetes | 20 | 518 | 361 |
| 7 | Nephritis | 20 | 599 | 502 |
| 8 | Hypertonus | 20 | 639 | 522 |
| 9 | Chronischer Gelenkrheumatismus | 20 ¹ / ₂ | 545 | 443 |
| 10 | Asthma bronchiale | 20 ¹ / ₂ | 537 | 485 |
| 11 | Diabetes | 21 | 522 | 450 |
| 12 | Vitium cordis | 21 | 522 | 455 |
| 13 | Nephrolithiasis | 21 | 580 | 411 |
| 14 | Prämenstruelle Magenbeschwerd. | 22 ¹ / ₂ | 513 | 448 |
| 15 | Morbus Basedow | 22 ¹ / ₂ | 679 | 595 |
| 16 | Thyreotoxikose | 24 | 512 | 477 |
| 17 | Cholecystopathie | 24 | 546 | 442 |
| 18 | Paroxysmelle Tachykardie | 24 | 586 | 500 |
| 19 | Cholecystopathie | 24 | 572 | 458 |
| 20 | Carcinoma ventriculi | 24 | 596 | 533 |
| 21 | Neurose | 24 | 537 | 423 |
| 22 | Cholecystopathie | 24 ¹ / ₂ | 650 | 420 |
| 23 | Herzinfarkt | 27 | 445 | 404 |
| 24 | Asthma bronchiale | 29 | 537 | 412 |
| 25 | Diabetes | 41 ¹ / ₂ | 525 | 440 |
| 26 | Neurose | 44 | 551 | 350 |
| 27 | Thyreotoxikose | 46 | 577 | 361 |
| 28 | Chronischer Gelenkrheumatismus | 48 | 529 | 383 |
| 29 | Thyreotoxikose | 49 ¹ / ₂ | 555 | 327 |
| 30 | Cholecystopathie | 60 | 528 | 364 |
| 31 | Diabetes | 60 ¹ / ₂ | 525 | 404 |
| 32 | Asthma bronchiale | 63 | 537 | 297 |
| 33 | Ovarialtumor | 89 ¹ / ₂ | 555 | 228 |

Wie sich aus Tab. 8 ergibt, schwankt der Bicarbonatgehalt in der Entzündungsflüssigkeit bei verschiedenen Patienten bei gleicher Dauer der Entzündung beträchtlich. Ohne daß bestimmte Krankheitsgruppen sich unterscheiden, ist aus der Tabelle nur ersichtlich, daß die Entzündung zwar einen einheitlich verlaufenden Vorgang mit spezifischen entzündlichen Reaktionen darstellt, daß aber die Geschwindigkeit des Ablaufs dieser Reaktionen bei verschiedenen Individuen beträchtlich differiert.

IV. Sauerstoffgehalt der Entzündungsflüssigkeit.

Nachdem der Gehalt der entzündlichen Flüssigkeit an gelösten festen Substanzen untersucht und ein sehr geringer Austausch zwischen

Normal- und Entzündungsgewebe für alle untersuchten Stoffe festgestellt war, lag es nahe, auch den Gasaustausch zwischen normalem und entzündlichem Gewebe zu messen. Wäre der Abschluß des Entzündungsraumes vollständig, so müßte schon nach Verlauf weniger Stunden beispielsweise der in der entzündlichen Flüssigkeit gelöste Sauerstoff durch die Atmung der entzündlichen Zellen verbraucht sein. Andererseits nimmt mit dem zunehmenden Zerfall der entzündlichen Zellen auch ihr Sauerstoffverbrauch ab, so daß nach längerer Entzündungszeit auch bei sehr vermindertem Sauerstoffzustrom noch Sauerstoff in der Entzündungsflüssigkeit nachweisbar bliebe.

Maximal würden im Beginn der Exsudation entsprechend der Löslichkeit des Sauerstoffs bei $37,5^{\circ}$ ($\alpha_{O_2} = 0,024$) und dem mittleren Sauerstoffdruck der Capillaren¹⁴ von 114 mm Hg in 1 ccm entzündlicher

Flüssigkeit $\frac{114 \cdot 24}{760} = 3,6$ cmm Sauerstoff gelöst sein, also nur eine sehr

geringe Sauerstoffmenge im Vergleich zum Sauerstoffgehalt des Blutes, das ja neben dem physikalisch gelösten noch 30–60 mal so viel chemisch gebundenen Hämoglobinsauerstoff enthält.

Methode.

Die Messungen geschahen manometrisch: Die Blase wird unter Paraffin punktiert, die Flüssigkeit unter Vermeidung von Luftzutritt in ein mit Wasserstoff gefülltes Manometergefäß gegeben und durch Schütteln der Sauerstoff aus der Flüssigkeit in den Gasraum getrieben. Entsprechend dem Sauerstoffpartialdruck O des Gasraums tritt dabei praktisch der gesamte Sauerstoff der Flüssigkeit in den Gasraum über. Durch einen elektrischen Funken wird der Sauerstoff mit dem Wasserstoff zu H_2O verbunden und aus dem entstehenden negativen Druck, multipliziert mit der Gefäßkonstanten, der Sauerstoffgehalt der Flüssigkeit berechnet.

Eine Fehlerquelle wäre bei höheren Ammoniakkonzentrationen der zu untersuchenden Flüssigkeit das Auftreten eines positiven Drucks infolge der Zerlegung von Ammoniak in Wasserstoff und Stickstoff durch den elektrischen Funken. Um diesen Fehler auszuschalten, wird das Ammoniak durch Zugabe einer Säure gebunden.

Als Manometergefäß diente die bekannte Warburgsche Kegelvorlage mit 15–22 ccm Inhalt, auf deren seitlich eingeschliffenen Ventilstopfen luftdicht eine Glasspritze aufgesetzt werden kann. Zur Erzeugung der Funken sind 2 Platindrähte mit einer Funkenstrecke von ungefähr 20 mm eingeschmolzen (Abb. 2).

Um alles Gas zwischen Spritze und Gefäß zu entfernen, werden ungefähr 0,2–0,5 ccm der zu untersuchenden Flüssigkeit durch den offenen Ventilstopfen in das Manometergefäß gedrückt, der Stopfen ge-

geschlossen, die eingespritzte Flüssigkeitsmenge aus dem Gefäß wieder entfernt, zur Bindung des Ammoniaks konzentrierte Salzsäure (0,1 bis 0,5 ccm) in den Hauptraum, zur Bindung der Kohlensäure 5% Kalilauge (0,1–0,2 ccm) in den Anhang gegeben, die Vorlage mit dem Manometer wie üblich verbunden und Wasserstoff durchgeleitet.

Durch Erwärmen des Manometergefäßes und Öffnen des Manometerhahnes wird ein Unterdruck erzeugt, so daß der beim Einfüllen der Flüssigkeit in das geschlossene Gefäß auftretende Überdruck vermieden wird. Um sicher zu sein, daß der Sauerstoffgehalt im Gasraum vor dem Einfüllen der Flüssigkeit gleich 0 ist, werden nach dem Schließen der Manometerhähne im Gasraum Funken erzeugt oder der Hahn zu einer mit Phosphor gefüllten Anhangsbirne geöffnet. Danach wird die Flüssigkeit eingefüllt (1–5 ccm, an der graduierten Spritze abgelesen oder nach dem Versuch durch Wägung bestimmt), im Thermostaten bei 17–20° C bis zur Druckkonstanz geschüttelt und solange (2–5 mal) ein Funken erzeugt, bis keine Druckänderung mehr eintritt.

Ist h der abgelesene negative Druck in Millimeter Sperrflüssigkeit (Brodiesche Flüssigkeit), h_{O_2} der Druck, der durch Verschwinden des Sauerstoffes, h_{H_2} der Druck, der durch Verschwinden des Wasserstoffes entsteht, so ist

$$h = h_{O_2} + h_{H_2}. \quad (1)$$

Versteht man unter k_{O_2} die Gefäßkonstante für Sauerstoff, unter k_{H_2} die Gefäßkonstante für Wasserstoff, so ist die verschwundene Sauerstoffmenge

$$x_{O_2} = h_{O_2} \cdot k_{O_2}, \quad (2)$$

die verschwundene Wasserstoffmenge

$$x_{H_2} = h_{H_2} \cdot k_{H_2}. \quad (3)$$

Da entsprechend einem Volumen Sauerstoff zwei Volumina Wasserstoff verschwinden,

$$x_{O_2} = \frac{x_{H_2}}{2}, \quad (4)$$

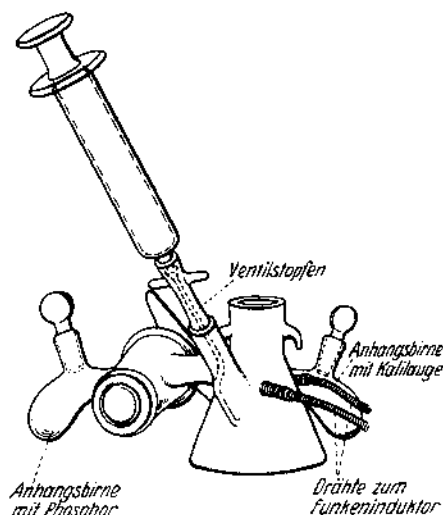


Abb. 2.

452

W. Kempner und E. Peschel:

so ergibt sich aus Gleichung 1-4:

$$x_{O_2} = h \cdot \frac{k_{O_2} \cdot k_{H_2}}{2 k_{O_2} + k_{H_2}}.$$

Bezeichnet man mit F_{O_2} die in 1 ccm Flüssigkeit enthaltene Sauerstoffmenge in Kubikmillimeter, so ist

$$F_{O_2} = \frac{x_{O_2}}{\text{untersuchte Flüssigkeitsmenge}}.$$

Bei einem Partialdruck von 100% O_2 wäre F_{O_2} für die Blasenflüssigkeit, entsprechend dem Absorptionskoeffizienten für Sauerstoff bei $37,5^\circ C$, = 24. Messungen von Blasen- und Lumbalflüssigkeit, mit 5% $CO_2/95\% O_2$ und Luft gesättigt, ergaben einen Meßfehler von 1-3%.

Die Methode ermöglicht bei genügender Flüssigkeitsmenge (4 ccm) die Messung eines Sauerstoffgehalts, der einem Sauerstoffdruck von $4 \cdot 10^{-3}$ Atmosphären (= 3,04 mm Hg) entspricht.

Ergebnisse.

Als nicht entzündliche Körperflüssigkeiten wurden Plasma, Lumbalflüssigkeit, Stauungsascites und Pleuratranssudat auf ihren Sauerstoffgehalt untersucht. Der Sauerstoffgehalt in der Blasenflüssigkeit wurde, wie üblich, nach verschieden langer Dauer der Pflastereinwirkung gemessen (Tab. 9 und 10).

Tabelle 9. Sauerstoffgehalt nichtentzündlicher Körperflüssigkeiten.

| | Kubikmillimeter O_2 in 1 ccm Flüssigkeit | = Sauerstoff- druck in mm Hg |
|-----------------------------|--|---------------------------------|
| Plasma | 3,34 | 106 |
| Lumbalflüssigkeit I . . . | 4,43 | 140 |
| Lumbalflüssigkeit II . . . | 3,02 | 96 |
| Lumbalflüssigkeit III . . . | 4,40 | 139 |
| Stauungsascites | 3,60 | 114 |
| Pleuratranssudat | 3,29 | 104 |
| Mittel | 3,68 | 117 |

Wie Tab. 9 und 10 zeigen, entspricht der Sauerstoffgehalt nicht entzündlicher Körperflüssigkeiten einem Sauerstoffdruck von 96-140 mm Hg. Der mittlere Sauerstoffgehalt nicht entzündlicher Körperflüssigkeiten entspricht einem Sauerstoffdruck von 117 mm Hg, das stimmt überein mit den in der Literatur für Plasma und für den mittleren Sauerstoffdruck der Capillaren angegebenen Werten (*Barcroft*¹⁵, *Bohr*¹⁶). In der Entzündungsflüssigkeit der Blase fanden wir nach kurzer Entzündungsdauer Sauerstoffmengen von durchschnittlich 2,20 cmm in 1 ccm, das entspricht einem Sauerstoffdruck von 70 mm Hg, nach langer Ent-

zündungsdauer (55–75 Stunden) war der Sauerstoffgehalt der entzündlichen gegenüber der nichtentzündlichen Flüssigkeit immer beträchtlich vermindert. Wir fanden als Minimalwert einen Sauerstoffgehalt von 0,19 cmm, das entspricht einem Druck von 6 mm Hg.

Tabelle 10. Sauerstoffgehalt der Entzündungsflüssigkeit.

| | Blasen von 15–34 Std. | | Blasen von 35–64 Std. | | Blasen von 65–75 Std. | |
|--------|-----------------------------|---------|-----------------------------|---------|-----------------------------|---------|
| | cmm O ₂ in 1 ccm | = mm Hg | cmm O ₂ in 1 ccm | = mm Hg | cmm O ₂ in 1 ccm | = mm Hg |
| | 3,66 | 116 | 1,18 | 37 | 0,50 | 16 |
| | 2,07 | 66 | 1,88 | 60 | 0,99 | 31 |
| | 2,88 | 91 | 0,58 | 18 | 0,28 | 8 |
| | 1,17 | 37 | 1,71 | 54 | 0,64 | 20 |
| | 1,45 | 46 | 0,96 | 30 | 1,27 | 40 |
| | 4,15 | 129 | — | — | 0,85 | 27 |
| | 2,43 | 77 | — | — | 0,19 | 6 |
| | 0,76 | 24 | — | — | — | — |
| | 1,24 | 39 | — | — | — | — |
| | 2,22 | 70 | — | — | — | — |
| Mittel | 2,20 | 70 | 1,26 | 40 | 0,67 | 21 |

Warburg¹⁷ hat an Kulturen von *Micrococcus candidans* untersucht, wie weit man mit dem Sauerstoffdruck heruntergehen muß, bis die Atmung sinkt, und fand selbst bei einem Sauerstoffdruck von 10^{-6} Atmosphären bei Versuchstemperaturen von 1–10° C unter geeigneten Bedingungen noch nahezu dieselbe Atmung wie bei Luft. Eine Anaerobiose im strengen Wortsinn besteht also nach unseren Versuchen innerhalb der Entzündungsflüssigkeit nicht — der Sauerstoffdruck in der entzündlichen Flüssigkeit wäre immer noch ausreichend für das Bestehen einer Atmung. Andererseits zeigen die Versuche, daß der Sauerstoffaustausch zwischen normalem und entzündlichem Gewebe so weit vermindert ist, daß sich in der entzündlichen Flüssigkeit (als Minimalwert) nur noch $\frac{1}{20}$ der in der Normalkörperflüssigkeit enthaltenen Sauerstoffmenge findet.

C. Zusammenfassung.

Setzt man voraus, daß die Reaktionen der Entzündung immer die gleichen und nur die Wirkungen dieser Reaktionen in den verschiedenen Organen verschieden sind, so könnte man versuchen, aus den an der entzündlichen Hautblase gefundenen Tatsachen die Vorgänge darzustellen, die während einer Entzündung überhaupt ablaufen:

Auf irgendeinen Reiz hin kommt es zu einer Exsudation und Einwanderung weißer Blutzellen. Die chemische Zusammensetzung der exsudierten Flüssigkeit bei der Exsudation ist die gleiche wie die des

Serums. Sind einmal Exsudat und entzündliche Zellen vorhanden, so beginnt innerhalb des entzündlichen Bereichs ein eigenes, vom normalen Gewebe getrenntes Leben, in dessen Mittelpunkt der Stoffwechsel der entzündlichen Zellen steht. Diese Trennung des entzündlichen Gewebes vom normalen — natürlich nicht die Aufhebung jeglicher Wechselwirkung zwischen Entzündungsraum und Gesamtorganismus (man denke an Schmerz oder Fieber), sondern die Störung des Gleichgewichts der Stoffe — ist bei verschiedener Stärke und Dauer der Entzündung mehr oder minder vollständig. Die Geschwindigkeit der entzündlichen Reaktionen ist abhängig von der vorhandenen Menge der entzündlichen Zellen. Die entzündlichen Zellen haben einen Oxydations- und Spaltungsstoffwechsel und verursachen durch diesen Stoffwechsel eine Säuerung des entzündeten Gewebes und eine Verarmung des Entzündungsraumes an Sauerstoff und energieliefernder Substanz. Säurebildung und Mangel an energieliefernder Substanz führen zu Schädigung oder Zerstörung des entzündeten Gewebes, zu Quellung, Degeneration und Nekrose.

Die Reaktionen der Entzündung wirken aber nicht nur zerstörend auf die entzündeten *Körperzellen*, sondern auch, sofern es sich nicht wie bei unserer Versuchsanordnung um sterile Entzündungen handelt, auf die *körperfremden* Zellen, durch die überhaupt die meisten Entzündungsprozesse bedingt sind, auf die Bakterien.

Diese, als isolierte und von den Leukocyten eingeschlossene Zellen, besitzen noch geringere Möglichkeit, die zum Leben notwendige Energie zu gewinnen, als die in näherer Verbindung mit noch gesundem Gewebe oder Capillarblut stehenden entzündeten Körperzellen, und werden aus den gleichen Gründen auch von der gebildeten Säure schwerer betroffen. Ist die Entzündung vorgeschritten, d. h. ist im Entzündungsraum der Zucker verbraucht und der Sauerstoffzustrom minimal, so können die Bakterien weder glykolysieren noch Zucker veratmen, und es ist möglich, daß bei dem zu dem Sauerstoffverbrauch der entzündlichen Zellen noch hinzukommenden beträchtlichen Sauerstoffverbrauch der Bakterien bei gleichbleibend geringem Sauerstoffzustrom sogar eine totale Anaerobiose eintritt und dadurch auch noch die Oxydationen von Eiweiß und Fett, also sämtliche energieliefernden Reaktionen unterbrochen sind.

Von solchen Gesichtspunkten ließe sich z. B. auch die schlechtere Heilungsfähigkeit bakterieller Entzündungen bei diabetischen Patienten erklären: Während bei nicht diabetischen Patienten nach 2—3 Tagen der Zucker innerhalb des Entzündungsraumes bereits verbraucht ist und den Bakterien als Energiequelle fehlt, ist bei diabetischen Patienten zu dieser Zeit der Zuckergehalt noch beträchtlich und gibt den Bakterien ausreichende Lebensmöglichkeiten.

Daß außer den Stoffwechselreaktionen der entzündlichen Zellen — Zucker- und Sauerstoffverarmung, Milchsäurebildung — noch spezifische

„Abwehrfermente“ des entzündeten Gewebes und der entzündlichen Zellen wirksam sind, wird nicht bestritten. Doch ist ein großer Teil bactericider Wirkungen sicher bedingt nur durch den Stoffwechsel der Entzündung.

Bei den verschiedenen Erkrankungen überwiegt bald die heilende Wirkung der Entzündung durch Zerstörung der Bakterien, bald ihre schädigende Wirkung durch Zerstörung von Körperzellen oder die vom Ort der Entzündung ausgehenden heilenden oder schädigenden Wirkungen der Entzündung auf den Gesamtorganismus. Je nachdem, ob die Gefahr der Gewebszerstörung oder der Bakterienausbreitung größer ist, ob die Entzündung eine Gefahr oder eine Heilungsmöglichkeit für den Gesamtorganismus darstellt, wird man versuchen, die Reaktionen der Entzündung zu hemmen oder zu steigern.

Literaturverzeichnis.

- ¹ Scheller, Münch., med. Wschr. Nr 40 1652, 1926. — ² Gänsslen, Münch., med. Wschr. 1922, Nr 32, 1176; 1923, Nr 31, 1015; 1923, Nr 41, 127; 1924, Nr 7, 198. — ³ Kauffmann, Krkh.forschg 2, 5. — ⁴ Grafe, Dtsch. Arch. klin. Med. 102, 406 (1911). — ⁵ Levene u. Meyer, J. of biol. Chem. 11, 361 (1912). — ⁶ Bakker, Dissertation. Groningen 1926. — ⁷ Fleischmann u. Kubowitz, Biochem. Z. 181, 395 (1927). — ⁸ Fujita, Klin. Wschr. 1928, Nr 19, 897. — ⁹ Schlossmann, Biochem. Z. 219, 4—6. — ¹⁰ Peschel, Klin. Wschr. 1930, Nr 23, 1061. — ¹¹ Warburg, Stoffwechsel der Tumoren. Berlin 1926. — ¹² Scheller, Münch. med. Wschr. 1926, Nr 45, 1879. — ¹³ Schade, Die physik. Chemie in der inneren Medizin. Dresden 1923. — ¹⁴ Loewy, in: Oppenheimer, Handbuch der Biochemie, Bd. 6. — ¹⁵ Barcroft u. Nagahashi, J. of Physiol. 55 (1921). — ¹⁶ Bohr, Zitiert von Liljestrand in: Handbuch der normalen und pathologischen Physiologie, Bd. 2. — ¹⁷ Warburg u. Kubowitz, Biochem. Z. 214, 1—3.

Stoffwechsel leukämischer Lymphocyten
[Metabolism of Leukemic Lymphocytes]

Metabolism of Leukemic Lymphocytes

By Ernst Peschel

The nature and causes of the leukemias are not known. In contrast to the metabolism of "normal" leukocytes and—even more significantly—to that of cancerous tumors, leukemic lymphocytes have a purely oxidative metabolism; they have no aerobic glycolysis at all. Their respiration is sufficient to cause the formed lactic acid to disappear. Thus the leukemic cells, according to their metabolic type, are by no means tumor cells but normal, juvenile tissue cells. They are as unlikely to be carriers of the disease as the juvenile red blood cells are to be carriers of pernicious anemia. A transformation from "normal" leukocytes to tumor cells by the way of "leukemic degeneration" of cell types is therefore impossible.

SONDERDRUCK AUS
**KLINISCHE
 WOCHENSCHRIFT**

ORGAN DER GESELLSCHAFT DEUTSCHER NATURFORSCHER UND ÄRZTE
 VERLAG VON JULIUS SPRINGER, BERLIN, UND J. F. BERGMANN, MÜNCHEN

JAHRG. 9

7. JUNI 1930

Nr. 23, S. 1061/1062

**STOFFWECHSEL LEUKÄMISCHER
 LYMPHOCYTEN*.**

Von

ERNST PESCHEL, Berlin.

Aus der II. Med. Klinik der Charité (Direktor: Prof. Dr. G. v. BERGMANN).

Wesen und Ursachen der Leukämien sind unbekannt. Die ältere Literatur rechnete sie zu den bösartigen Geschwülsten und meinte, die leukämischen Zellen seien entweder in der Blutbahn degenerierte Zellen oder Metastasen von Myelomen und Lymphomen. Noch RIBBERT¹ sprach in seiner Geschwulstlehre von der lymphatischen Leukämie als „einer Variation des Lymphosarkoms, bei der die Geschwulstzellen sich durch Vermittelung des Kreislaufs im Körper verbreiten“. Die moderne pathologische Anatomie ordnet die Leukämien ein unter die hyperplastischen Neubildungen, nicht mehr unter die echten Blastome².

Neuerdings wurden vom Standpunkt der Gewebszüchtung die Beziehungen zwischen malignen Tumoren und weißen Blutzellen wieder hervorgehoben. A. FISCHER³ fand eine große morphologische und biologische Ähnlichkeit zwischen den aus dem strömenden Hühnerblut gewonnenen Monocyten und den amöboiden Zellen des explantierten Rous-Sarkoms. Diese „Sarkomonocyten“ erwiesen sich bei Versuchen von FISCHER und CARREL⁴ als die Träger der Malignität. CARREL konnte ferner die Blutmonocyten in bösartige Sarkomzellen umformen, indem er sie mit einem Sarkomfiltrat behandelte. Nach diesen Versuchen erschien eine Verwandtschaft zwischen Tumorzellen und weißen Blutkörperchen wahrscheinlich.

Durch WARBURGS Entdeckung der aeroben Glykolyse bösartiger Geschwülste⁵ ist an Stelle morphologischer Ähnlichkeiten eine quantitativ exakte Unterscheidung zwischen normalen und degenerierten Zellen gegeben: einzig die Tumoren haben neben ihrer Atmung noch einen großen

* Nach Abschluß dieser Arbeit erschien in der Biochem. Z. 219 4–6, eine Arbeit von HANS SCHLOSSMANN über den Stoffwechsel der Lymphocyten bei einem Fall von lymphatischer Leukämie. Die Fragestellung beider Arbeiten ist verschieden, die Befunde (für uns das Wichtigste: das Fehlen der aeroben Glykolyse leukämischer Lymphocyten) stimmen überein.

Spaltungsstoffwechsel und vermögen durch diesen Spaltungsstoffwechsel auch unter anaeroben Bedingungen zu leben.

Eine scheinbare Ausnahme machen die kernlosen roten Blutkörperchen der Säugetiere und die weißen Blutzellen, die im Gegensatz zu den übrigen Körperzellen ebenfalls, wenn auch geringer als die Tumoren, aerob glykolsieren. Für die roten Blutkörperchen konnte WARBURG zeigen, daß ihre Atmung in der Jugend größer ist und erst bei den „alten“ Erythrocyten die Atmung nicht mehr ausreicht, die entstehende Milchsäure zum Verschwinden zu bringen. Durch WARBURGS Untersuchungen weiß man, daß das Sinken der Atmung und das Auftreten einer aeroben Glykolyse Schädigung oder Absterben der Zellen anzeigt. Die aerobe Glykolyse der Erythrocyten ist also nur der stoffwechselmäßige Ausdruck der Tatsache, daß die Erythrocyten im Kreislauf innerhalb kurzer Zeit zugrunde gehen.

Für die aerobe Glykolyse der weißen Blutkörperchen war dieselbe Erklärung wahrscheinlich. Ihren Stoffwechsel haben verschiedene Autoren untersucht:

E. GRAFF⁶ fand, daß leukämisches Blut mehr Sauerstoff verbraucht als Normalblut.

A. BAKKER⁷ untersuchte die Atmung und die aerobe Milchsäurebildung von Kaninchenexsudatleukocyten. Er folgerte aus dem Verhältnis von Atmung zu Gärung, daß der Stoffwechsel der Leukocyten der gleiche sei wie der Stoffwechsel der Tumoren.

Im Warburgschen Institut haben FLEISCHMANN und KUBOWITZ⁸ den Stoffwechsel von Gänseblutleukocyten und Kaninchenexsudatleukocyten, FUJITA⁹ den Stoffwechsel von Rattenknochenmarkszellen und Rattenblutleukocyten gemessen.

Die Ergebnisse dieser Arbeiten sind in Tabelle 1 zusammengestellt.

Tabelle 1.

| Untersucher | Art der Leukocyten | Q_{O_2} Atmung | $Q_{M}^{O_2}$ (Milch- säure- bildung in Sauer- stoff) | $Q_{M}^{N_2}$ (Milch- säure- bildung in Stick- stoff) |
|----------------------------|----------------------------------|---------------------|--|--|
| BAKKER | Kaninchen-Exsudat- Leukocyten | — 0,4 | + 6 | |
| FLEISCHMANN u. KUBOWITZ | Gänseblut-Leukocyten | — 4,9 | + 1,8 | + 11,6 |
| FLEISCHMANN u. KUBOWITZ | Kaninchen-Exsudat- Leukocyten | — 4,5 | + 14 | + 23,3 |
| FUJITA | Rattenknochenmarks- zellen | — 9,8 | + 3,7 | + 21 |
| FUJITA | Rattenblut-Leukocyten | — 9,2 | + 2,6 | + 20,2 |

— 3 —

Alle Untersucher haben also übereinstimmend gefunden, daß die weißen Blutkörperchen auch unter aeroben Bedingungen Zucker in Milchsäure spalten; am stärksten die Exsudatleukocyten, die bereits innerhalb des Körpers am meisten geschädigten Blutzellen.

Sind bei den Leukämien die weißen Blutzellen krankhaft veränderte oder bösartig degenerierte Zellen, so werden sie noch stärker abweichen vom Stoffwechsel normaler Zellen als die „gesunden“ Leukocyten oder sogar einen Carcinomstoffwechsel zeigen. Es war deshalb zu erwarten, daß die aerobe Milchsäurebildung, die bei normalen Gewebszellen gleich Null ist, bei leukämischen Leukocyten noch größer sei als bei „normalen“ Leukocyten.

Die Untersuchungen — an 4 Patienten mit lymphatischer Leukämie — ergaben das Gegenteil (Tabelle 2).

Tabelle 2.

| | Leukocytenzahl in cmm | Q_{O_2} Atmung | $Q_{O_2}^{aer}$ Aerobe Glykolyse | $Q_{O_2}^{ana}$ Anaerobe Glykolyse |
|---|--------------------------|---------------------|--|--|
| 1 | 80 000 | — 3,8 | 0 | |
| 2 | 240 000 | — 3,5 | 0 | |
| 3 | 350 000 | — 10,5 | 0 | + 11,7 |
| 4 | 430 000 | — 5,4 | 0 | + 10,4 |

Im Gegensatz zum Stoffwechsel „normaler“ Leukocyten und erst recht des Carcinoms besitzen leukämische Lymphocyten einen reinen Oxydationsstoffwechsel, sie glykolysieren aerob überhaupt nicht. Ihre Atmung reicht aus, die gebildete Milchsäure zum Verschwinden zu bringen. Die leukämischen Zellen sind ihrem Stoffwechseltypus nach also keineswegs Geschwulstzellen, sondern normale junge Gewebszellen und ebensowenig wie etwa die jugendlichen roten Blutzellen bei der perniziösen Anämie Träger der Krankheit. Ein Übergang von „normalen“ Leukocyten in Tumorzellen auf dem Wege über „leukämisch degenerierte“ Zellformen ist demnach ausgeschlossen.

Die aerobe Glykolyse der Exsudat- und reifen Blutleukocyten ist — entsprechend der Annahme WARBURG'S — nur der Ausdruck ihres Absterbens im Körper.

Methode. Das Blut wurde in Citratlösung aus der Armvene steril entnommen, kurz zentrifugiert, das Plasma mit den Leukocyten von dem roten Sediment abgehoben. Die Verunreinigung mit Erythrocyten und Thrombocyten ist bei leukämischem Blut gering und wurde vernachlässigt.

Das Trockengewicht der Leukocyten wurde bestimmt nach Zentrifugieren in einem spitz auslaufenden Röhrchen von ungefähr 5 ccm Inhalt, wovon der weitere Teil 4,5 ccm, der verjüngte 0,5 ccm enthielt (s. Abb. 1).

— 4 —

Das Plasma wurde mit einer Capillare abgesaugt, das Zentrifugat bei 99° getrocknet. Für die Wägung (Mikrowaage) wurde das untere, das Zentrifugat enthaltende Ende des Röhrchens abgefeilt, gewogen und nach Reinigung das Leergewicht des Glases bestimmt.

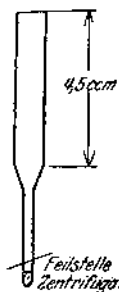


Abb. 1.

In den anaeroben Versuchen wurde die Atmung durch $\frac{1}{400}$ -Blausäure gehemmt.

Der Zellstoffwechsel und die Retention des Plasmas wurden nach den von WARBURG angegebenen Methoden manometrisch gemessen.

Protokoll.

Lymphocyten, gemessen in Citratplasma, dem 1 g Glucose pro Liter zugesetzt war. $37,5^\circ\text{C}$. Bicarbonatgehalt: $1,6 \cdot 10^{-2}$ Mole/Liter. 3 ccm Plasma enthielten 8,19 mg Leukocyten-trocken-substanz (Tabelle 3).

Tabelle 3.

| | Gefäß A | Gefäß B | Gefäß C |
|--------------------------|--|--|--|
| Gasraum | 5% CO_2 in O_2 | 5% CO_2 in O_2 | 5% CO_2 in O_2 $0,15 \frac{1}{20}$ HCN |
| Volumina (ccm) | $V_F = 6$ $V_G = 6,29$ | $V_F = 3$ $V_G = 9,18$ | $V_F = 3,15$ $V_G = 9,03$ |
| Gefäßkonstanten (qmm) | $K_{\text{O}_2} = 0,568$ $K_{\text{CO}_2}^{\text{Ringer}} = 0,878$ $\left(\frac{\partial u}{\partial p}\right)_G = 0,033$ $K_{\text{CO}_2}^{\text{Plasma}} = 1,076$ | $K_{\text{O}_2} = 0,815$ $K_{\text{CO}_2}^{\text{Ringer}} = 0,970$ $\left(\frac{\partial u}{\partial p}\right)_G = 0,033$ $K_{\text{CO}_2}^{\text{Plasma}} = 1,069$ | $K_{\text{CO}_2}^{\text{Ringer}} = 0,965$ $\left(\frac{\partial u}{\partial p}\right)_M = 0,052$ $K_{\text{CO}_2}^{\text{Plasma}} = 1,121$ |
| Druckänderung in 30 Min. | $H = -41,5$ | $H = -8,5$ | $H = +37$ |
| Druckänderung in 30 Min. | $H = -42$ | $H = -9,5$ | $H = +39$ |
| | $Q_{\text{O}_2} = -5,4$ $Q_{\text{CO}_2} = +4,7$ $Q_{\text{H}^+} = 0$ | | $Q_{\text{H}^+} = +10,4$ |

Literatur: ¹ RIBBERT, Geschwulstlehre. Bonn 1904. — ² BORST in: ASCHOFF, Pathologische Anatomie. Jena 1923. — ³ FISCHER, Arch. exper. Zellforsch. 3, 362. — ⁴ CARREL, C. r. Soc. Biol. Paris 91, 1069 (1924). — ⁵ WARBURG, Stoffwechsel der Tumoren. Berlin 1926. — ⁶ GRAFF, Dtsch. Arch. klin. Med. 102, 406 (1911). — ⁷ BAKKER, Dissertation. Groningen 1926. — ⁸ FLEISCHMANN und KUBOWITZ, Biochem. Z. 181, 395 (1927). — ⁹ FUJITA, Klin. Wschr. 1928, Nr 19, 897.

Krebsstoffwechsel und Entzündung
[Cancer Metabolism and Inflammation]

Cancer Metabolism and Inflammation

by Ruth Lohmann

The past decade has seen fundamental changes in the questions posed by cancer research. With the discoveries of O. Warburg, morphologic anatomy—the specific distinguishing characteristics of tumor tissue in a pathological specimen—has given way to tumor physiology: how do the cells of malignant tumors differ in their behavior from healthy body cells?

Warburg found a fundamental difference between the energy-supplying reactions of normal body cells and tumor cells. Normal body cells, which live by respiration, will die in the absence of oxygen; but tumor cells have, in addition to respiration, another possibility for obtaining sufficient energy. Through cleavage of sugar, they can live and grow even in the complete absence of oxygen.

Kempner and Peschel found that inflamed tissue becomes isolated from normal tissue in proportion to the extent of inflammation. In the inflammatory area a separate life begins independent of normal tissue, central to which is the metabolism of the inflammatory cells. The metabolism of the inflammatory cells is an injury metabolism of dying cells, with large respiration and glycolysis; it causes the following changes in the inflammatory fluid:

- reduction of oxygen content
- increase in carbonic acid content
- reduction of sugar content
- increase in lactic acid content
- reduction of bicarbonate content
- lowering of pH.

One would assume, accordingly, that the state of inflammation in a tissue provides the poorest conditions for the life and growth of malignant tumor cells, and it would perhaps be possible that the tumor cells would die under these conditions. Indeed, this study found that aerobic glycolysis of tumor cells in inflammatory fluid was consistently and significantly reduced in comparison to that of tumor cells in serum. In inflammatory fluids obtained from healthy subjects after about 50 hours of inflammation, the aerobic glycolysis of the tumor cells disappeared almost completely, i.e., the tumor cells no longer exhibited specific tumor metabolism in the inflammatory environment, but rather the metabolism of normal tissue.

On the basis of these findings, one has to ask whether, with a sufficient supply of oxygen, tumor cells can survive in an inflammatory environment from oxidation of fat and protein. It turns out that, if we allow the inflammatory fluid to act long enough on the tumor cells, they will die.

The question arose, how long can tumor tissue survive under these practically

anaerobic conditions in an inflammatory milieu? Tissue sections of rat sarcoma were kept for 6 and 10 hours in inflammatory fluid saturated with 3% oxygen and then placed back into serum and the metabolism was measured under optimal conditions. After 6-hour exposure to the inflammatory fluid, the metabolism was greatly reduced; after 10 hours, the metabolism was practically zero. This means the tumor tissue had died within 10 hours under conditions of inflammation, while the tumor tissue kept in serum under constant conditions still exhibited its original metabolism.

Ideally, for prevention and treatment of tumors (without premature illusions of therapeutic realization) one should not only keep away noxious substances (which could cause degeneration of body cells) and remove or destroy degenerated cells by surgery, radium, or any tumor-specific substances. One must also (1) maintain the inflammatory propensity of the body so that every degenerating cell as it originates will be destroyed by isolation, starvation, and acidity and (2) combat the degenerated cells by increasing the inflammatory capacity and mobilizing the enhanced inflammatory responses of the tissues being attacked.

SONDERDRUCK AUS

KLINISCHE WOCHENSCHRIFT

ORGAN DER GESELLSCHAFT DEUTSCHER NATURFORSCHER UND ÄRZTE
VERLAG VON JULIUS SPRINGER, BERLIN, UND J. F. BERGMANN, MÜNCHEN

JAHRG. 10 26. SEPTEMBER 1931 Nr. 39, S. 1799/1802

KREBSSTOFFWECHSEL UND ENTZÜNDUNG*.

Von

RUTH LOHMANN.

Aus der II. Medizinischen Klinik der Charité, Berlin (Direktor: Prof. G. v. BERGMANN).

I. Physiologie der Tumorzellen.

Die Krebsforschung hat im letzten Jahrzehnt ihre Fragestellung grundsätzlich verändert. Neben die morphologische Anatomie: welches sind am toten Präparat die spezifischen Kennzeichen des Tumorgewebes? trat mit den Entdeckungen O. WARBURGS die Physiologie der Tumoren: wodurch unterscheiden sich in ihren Lebensäußerungen die Zellen der bösartigen Geschwülste von gesunden Körperzellen?

WARBURG¹ fand einen fundamentalen Unterschied zwischen den energieliefernden Reaktionen der normalen Körperzellen und der Tumorzellen: Die normalen Körperzellen leben durch ihre Atmung und gehen bei Abschluß von Sauerstoff zugrunde, die Tumorzellen besitzen außer der Atmung noch eine andere Möglichkeit, ausreichende Energie zu gewinnen, die Zuckerspaltung, so daß sie sogar bei vollständigem Sauerstoffabschluß leben und wachsen können.

Zwar ist die Fähigkeit der Zuckerspaltung keine spezifische Eigenschaft der Tumorzelle, denn unter anaeroben Bedingungen spalten die meisten tierischen Zellen. Geht man aber von anaeroben zu aeroben Bedingungen über, so ist bei allen normalen Körperzellen, sowohl den ruhenden wie den wachsenden embryonalen Zellen, die Milchsäurebildung gleich Null oder gering gegenüber der Atmung; die Atmung — wie schon PASTEUR gezeigt hat — bringt also die Milchsäure zum Verschwinden. Nur bei geschädigten und absterbenden Zellen reicht die Atmung nicht mehr aus, die gebildete Milchsäure zum Verschwinden zu bringen, so daß auch unter aeroben Bedingungen eine Glykolyse erscheint. Diese Phase des Stoffwechsels geschädigter Zellen vor ihrem endgültigen Absterben ist der *stationäre* Stoffwechsel der Tumorzellen. Bei Tumorzellen findet man stets, auch unter aeroben Bedingungen, eine große Glykolyse, und es ist sogar wahrscheinlich, daß das bösartige Wachstum der Tumoren gebunden ist an diese aerobe Spaltung und Säurebildung.

* Ausgeführt mit Unterstützung der Notgemeinschaft Deutscher Wissenschaft.

— 2 —

Die Größe der Tumorglykolyse sinkt mit abnehmendem Zucker- und Bicarbonatgehalt und mit steigender Wasserstoffionenkonzentration des Milieus: für die anaerobe Glykolyse von Tumoren fand WARBURG als Optimum etwa eine Zuckerkonzentration von 0,15 %, eine Bicarbonatkonzentration von $2,5 \cdot 10^{-2}$ molar, ein p_H von 7,58, also ungefähr die Bedingungen von Serum oder Gewebe.

Die Schwierigkeit, bösartige Geschwülste zu beeinflussen, wird so auch theoretisch erklärbar: Wäre es möglich, den Tumorzellen innerhalb des Körpers den Sauerstoff zu entziehen, könnten sie durch ihre Zuckerspaltung, würde man den Zucker entziehen, könnten sie durch ihre Oxydationen von Fett und Eiweiß leben. Serum und Gewebe bieten scheinbar optimale Bedingungen für den Stoffwechsel und das Wachstum der Tumoren.

II. Versuche der Tumorbehandlung.

Die Aufgabe der Tumorbehandlung — nach den Ergebnissen der Zellphysiologie — ist es, Bedingungen im Körper zu erzeugen, die die Atmung und Spaltung der Tumorzellen soweit wie möglich verhindern, d. h. ein Milieu zu erzeugen, in dem Sauerstoff, Zucker und Bicarbonat fehlen bei hohem Kohlensäuregehalt = saurer Reaktion.

Versuche, Tumorzellen durch Herabsetzung des Blutzuckergehalts zu schädigen, wurden von SILBERSTEIN², WITZLEBEN³ und RONDONI⁴ an Kaninchen und Mäusen ausgeführt. Sie fanden, daß Zuckermangel im Körper das Wachstum des Tumors hemmt, Zuckerezufuhr das Wachstum steigert.

WARBURG⁵ versuchte, den Blutzucker möglichst tief zu senken, indem er Tiere einige Stunden in Insulinkrämpfen ließ; eine Schädigung der Tumoren gelang nicht. Hielt er die Tiere mehrere Tage lang bei sehr niedriger Sauerstoffkonzentration, so fand er schwere Tumornekrosen. Doch da die Tumoren nicht empfindlicher gegen Verminderung des Sauerstoff- und Zuckergehalts waren als die normalen Körperzellen, so schien es unmöglich, Tumoren in vivo durch Sperrung der Energiequellen zu zerstören, ohne daß gleichzeitig auch die übrigen Körperzellen zugrunde gingen.

Von der Warburgschen Entdeckung ausgehend, daß die aerobe Glykolyse der Tumorzellen entsteht durch eine zu kleine, geschädigte Atmung und am größten ist im alkalischen Milieu, versuchte FISCHER-WASELS⁶, die bösartigen Geschwülste durch Steigerung ihrer Oxydationen und Säuerung des Gewebes zu behandeln. Er ließ Tumortiere und carcinomkranke Menschen Gasgemische von reinem Sauerstoff und hohem Kohlensäuregehalt einatmen und konnte in vielen Fällen über Hemmung des Tumorwachstums und vollständige Heilung berichten.

Die Versuche, meist unter den Voraussetzungen der Bakteriologie und Immunitätslehre, die Krebsentstehung zu

— 3 —

verhindern oder den Krebs zu heilen — mit virulenten oder abgetöteten Bakterien, spezifischem oder unspezifischem Serum, Eiweißkörpern, Organextrakten, Farbstoffen, Metallen, Diät — erscheinen vom Standpunkt der Zellphysiologie zunächst aussichtslos, die Resultate unwahrscheinlich. Die vorliegende Arbeit wird zeigen, daß eine Beeinflussung von Tumoren auf diesem Wege — wenn auch nur mittelbar — gerade nach den Gesetzen der Zellphysiologie durchaus möglich ist, ja daß die bei einigen Versuchen unter falschen Voraussetzungen gewonnenen Ergebnisse wichtig sind nicht nur für die Krebsbehandlung, sondern auch für die Kenntnis der Krebsentstehung (wobei unter „Versuchen“ wenige klinische und experimentelle Beobachtungen gemeint sind, während die Mehrzahl einer Kritik nicht standhält). An einige Beispiele sei hier erinnert:

EHRlich fand, daß bei Mäusen, die mit „abgeschwächtem“ Tumormaterial behandelt waren oder eine Infektionskrankheit, z. B. Recurrens, durchgemacht hatten, ein implantierter Tumor nicht anging oder schnell zurückgebildet wurde („erworbene Tumormunität“); bei einer Reihe von Tieren gelang ohne nachweisbaren Grund die Tumorumpfung überhaupt nicht („natürliche Tumormunität“).

FEHLEISEN⁷ behandelte 1883 in der Klinik ERNST v. BERGMANNs Patienten mit Mammacarcinom durch künstlich erzeugtes Erysipel. Er beobachtete ein sofortiges Kleinerwerden, „sogar vollständige Resorption“.

LUMSDEN⁸ behandelte Sarkomratten mit „Immunserum“. Er spritzte in die geschwulsttragende Extremität Serum von Kaninchen oder Ratten, die 6–8 Wochen lang einmal wöchentlich mit Rattensarkomgewebe immunisiert waren. „Damit die Wirkung des Immunserums auf die Geschwulst länger andauerte“, legte er eine Stauung oberhalb der behandelten Geschwulst oder injizierte gleichzeitig Adrenalin. Er fand regelmäßig Heilung der Tumoren.

Die Wirkung des Immunserums auf die Tumoren wurde erklärt durch die Annahme, Immunserum enthielte im Gegensatz zum Serum des Tumortieres tumorhemmende oder -auflösende Stoffe. Dann müßte der Tumorstoffwechsel im Immunserum sich unterscheiden von dem Stoffwechsel im Serum von tumorkranken Tieren. KEMPNER hat den Stoffwechsel von Jensen-Rattensarkomen in Tumorratten- und Kaninchenimmunserum untersucht und keinen Einfluß des Immunserums, weder auf die Atmung noch auf die Glykolyse der Tumoren, gefunden. Das Serum in Verbindung mit Stauung oder Adrenalin heilt also beim kranken Tier die Geschwülste, es ist aber *kein* Tumormunitäts- oder Immunserum; denn es besitzt keine unmittelbare zerstörende Wirkung auf Geschwulstgewebe, ebenso wenig wie bei der Erysipelbehandlung der Tumoren der isolierte „Streptococcus Fehleisen“ ohne Erysipel.

— 4 —

Wie sind solche Befunde der Beeinflussung maligner Tumoren und der Immunität gegen Geschwülste aus der Physiologie der Tumorzellen verständlich? Verfügen etwa der gesunde Organismus und die gesunden Gewebe über Reaktionen der Tumorerhaltung oder -zerstörung, und sind diese Reaktionen vielleicht durch irgendeine Behandlung auszulösen oder zu steigern?

Wir glauben, daß der Körper über derartige Reaktionen verfügt, und behaupten, es seien die unspezifischen „Reaktionen der Entzündung“.

III. Die „Reaktionen der Entzündung“.

KEMPNER und PESCHEL⁹ fanden, daß sich, entsprechend dem Ausmaß einer Entzündung, das entzündete Gewebe immer mehr vom normalen Gewebe abschließt und im Entzündungsraum ein eigenes, vom normalen Gewebe getrenntes Leben beginnt, in dessen Mittelpunkt der *Stoffwechsel der entzündlichen Zellen* steht. Der Stoffwechsel der entzündlichen Zellen, ein Schädigungsstoffwechsel absterbender Zellen, mit großer Atmung und Glykolyse, bewirkt in der Entzündungsflüssigkeit:

- I. Verminderung des Sauerstoffgehalts.
- II. Vermehrung des Kohlensäuregehalts.
- III. Verminderung des Zuckergehalts.
- IV. Vermehrung des Milchsäuregehalts.
- V. Verminderung des Bicarbonatgehalts.
- VI. Sinken des p_H .

Die von KEMPNER und PESCHEL gefundenen Maximal- bzw. Minimalzahlen sind in Tabelle 1 zusammengestellt.

Nach diesen Befunden müßte man annehmen, daß der Zustand der Entzündung in einem Gewebe für das Leben und Wachstum bösartiger Geschwulstzellen die schlechtesten Bedingungen bietet, und es wäre vielleicht möglich, daß unter diesen Bedingungen die Geschwulstzellen zugrunde gingen. Denn wie die Tabelle zeigt, ist der Sauerstoff- und Zuckergehalt im Entzündungsraum minimal, so daß beide Energiequellen der Tumorzelle, Atmung und Gärung, versperrt sind. Und wären selbst ausreichend Sauerstoff und Zucker im Entzündungsraum vorhanden, so würde doch die Glykolyse durch die geringe Bicarbonat- und hohe Kohlensäurekonzentration gehemmt.

Tabelle 1.

| | Serum | Entzündungs- flüssigkeit |
|----------------------------|--------------------------|-----------------------------|
| Sauerstoffdruck | 117 mm Hg | 6 mm Hg |
| Zuckergehalt | 100 mg % | 6 mg % |
| Milchsäuregehalt | 10 mg % | 125 mg % |
| Bicarbonatgehalt | $25 \cdot 10^{-3}$ molar | $8,9 \cdot 10^{-3}$ molar |
| p_H | 7,48 | 6,29 |

— 5 —

tration gehemmt werden. Denn das Optimum der glykolytischen Wirksamkeit der Tumorzelle liegt, wie bereits erwähnt, bei alkalischer Reaktion und ist abhängig vom Bicarbonatgehalt — die Reaktion im Entzündungsraum ist sauer, der Bicarbonatgehalt ist um 60 % vermindert. Der Stoffwechsel einer Tumorzelle müßte also in einer entzündlichen Flüssigkeit ein anderer sein als in einer normalen Körperflüssigkeit wie Gewebssaft oder Blutserum.

Es wurde deshalb der Tumorstoffwechsel untersucht in einer solchen Entzündungsflüssigkeit und unter den Bedingungen, wie sie im Entzündungsbereich gefunden waren.

IV. Versuche über den Einfluß der Entzündung auf den Tumorstoffwechsel.

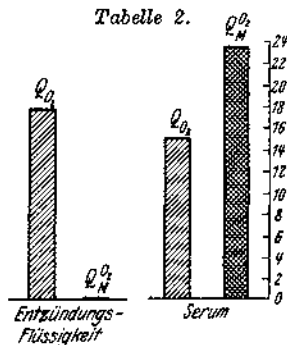
Methode. Die Messungen der Atmung und aeroben Glykolyse von Tumorzellen geschahen in Serum und in entzündlichen Flüssigkeiten vom Menschen: dem Inhalt durch Cantharidenpflaster erzeugter Hautblasen und Pleuraexsudaten. Als Tumorzellen wurden Schnitte von Jensenschem Rattensarkom und menschlichen Spontancarcinomen* benutzt.

Die Messungen geschahen bei einer Kohlensäurekonzentration von ungefähr 10 %, so daß bei einer Bicarbonatkonzentration von $15,5-20,8 \cdot 10^{-3}$ molar sich Wasserstoffionenkonzentrationen von $p_{\text{H}} = 6,96-7,09$ ergaben. Sofort nach der Punktion unter Paraffin wurden in den gleichen Entzündungsflüssigkeiten mit der Chinhydronelektrode Werte von 6,4–6,8 gemessen. Die Wasserstoffionenkonzentration im Versuch war also noch wesentlich günstiger für den Stoffwechsel der Tumorzellen als im Entzündungsbereich des Körpers.

Die Sauerstoffsättigung im Versuch war 1. optimal (90% $O_2/10\%$ CO_2) in der Annahme, daß trotz des Abschlusses des Entzündungsraumes vom normalen Gewebe eine ausreichende Sauerstoffdiffusion möglich sei, 2. dem Sauerstoffdruck entsprechend, wie ihn KEMPNER und PESCHEL als durchschnittliche Sauerstoffsättigung in der Entzündungsflüssigkeit nach 3tägiger Entzündungsdauer gefunden haben (3% $O_2/10\%$ CO_2/N_2).

Die Entzündungsflüssigkeit wurde nach 24–48 stündiger Pflastereinwirkung steril punktiert — das Alter der Pleuraexsudate war nicht genau festzustellen —, die Zellen abzentrifugiert und die

Tabelle 2.



Atmung und Glykolyse von Sarkomgewebe in Serum und Entzündungsflüssigkeit bei optimaler Sauerstoffsättigung.

* Für Überlassung des Rattensarkomstammes sind wir Herrn Prof. HANS HIRSCHFELD vom Krebsinstitut, für Überlassung des menschlichen Tumormaterials Herrn Prof. NISSEN und Herrn Dr. GOHRBANDT aus der Chirurgischen Klinik, Berlin, zu großem Dank verpflichtet.

Tabelle 3. Stoffwechsel von Rattensarkomgewebe (1–5) und Menschencarcinomgewebe (6) in Serum und Entzündungsflüssigkeit bei optimaler Sauerstoffsättigung.

| Flüssigkeit | Zucker- gehalt mg % | Bicarbonat- gehalt mol. | O ₂ -Druck % | CO ₂ -Druck % | p _H | Q _{O₂} (Atmung) | Q _{O₂} (Aerobe Glykolyse) |
|--|---------------------------|-------------------------------|----------------------------|-----------------------------|----------------|---|---|
| | | | | | | cm ³ Sauerstoff mg Gewebe · Stunden | cm ³ Milchsäure mg Gewebe · Stunden |
| 1. Serum | 100 | 25 · 10 ⁻³ | 95 | 5 | 7,48 | 15,6 | 24,2 |
| Entzündungsflüssigkeit (Blasenflüssigkeit) | 7 | 15,5 · 10 ⁻³ | 90 | 10 | 6,96 | 20,4 | 0 |
| 2. Serum | 100 | 25 · 10 ⁻³ | 95 | 5 | 7,48 | 14,7 | 24,2 |
| Entzündungsflüssigkeit (Blasenflüssigkeit) | 7 | 15,5 · 10 ⁻³ | 90 | 10 | 6,96 | 19,5 | 0 |
| 3. Serum | 100 | 25 · 10 ⁻³ | 95 | 5 | 7,48 | 10,0 | 23,1 |
| Entzündungsflüssigkeit (Blasenflüssigkeit) | 12 | 17,1 · 10 ⁻³ | 90 | 10 | 7,00 | 12,1 | 0,9 |
| 4. Serum | 100 | 25 · 10 ⁻³ | 95 | 5 | 7,48 | 14,1 | 18,7 |
| Entzündungsflüssigkeit (Blasenflüssigkeit) | 39 | 20,8 · 10 ⁻³ | 90 | 10 | 7,09 | 10,7 | 6,1 |
| 5. Serum | 100 | 25 · 10 ⁻³ | 95 | 5 | 7,48 | 12,9 | 20,7 |
| Entzündungsflüssigkeit (Pleura - Exsudat) | 26 | 16,2 · 10 ⁻³ | 90 | 10 | 6,98 | 15,1 | 4,3 |
| 6. Serum | 100 | 25 · 10 ⁻³ | 95 | 5 | 7,48 | 2,7 | 11,4 |
| Entzündungsflüssigkeit (Blasenflüssigkeit) | 37 | 12,5 · 10 ⁻³ | 90 | 10 | 6,88 | 8,1 | 3,1 |

— 7 —

Flüssigkeit bei 37,5° mit den verschiedenen Gasgemischen gesättigt.

Ergebnisse. Die aerobe Glykolyse der Tumorzellen ist in der Entzündungsflüssigkeit gegenüber Serum immer beträchtlich vermindert. In Entzündungsflüssigkeiten, die von gesunden Menschen nach ungefähr 50stündiger Entzündungsdauer gewonnen wurden, war die aerobe Glykolyse der Tumorzellen fast vollständig verschwunden, d. h. die Tumorzellen zeigen im Milieu der Entzündung nicht mehr den spezifischen Tumorstoffwechsel, sondern den Stoffwechsel normaler Gewebe (Tabelle 2 und 3).

Nach diesen Befunden war zu fragen: Sind Tumorzellen imstande, im Milieu der Entzündung bei ausreichendem Sauerstoffzustrom von ihren Fett- und Eiweißoxydationen zu leben? Es zeigte sich: Läßt man die Entzündungsflüssigkeit lange genug auf die Tumorzellen einwirken, so gehen sie darin zugrunde.

Schnitte von Rattensarkomen wurden nach 6-, 10-, 14stündigem Aufenthalt in entzündlicher Flüssigkeit wieder in normales Serum gebracht und ihr Stoffwechsel gemessen. Schon nach 6stündiger Einwirkung der Entzündungsflüssigkeit war nicht nur die aerobe Glykolyse, sondern auch die Atmung beträchtlich vermindert. Nach 14stündiger Einwirkung der Entzündungsflüssigkeit war Atmung und Glykolyse der Tumorzellen gleich Null, d. h. die Tumorzellen waren abgestorben, während das im Serum unter konstanten Bedingungen gehaltene Tumorgewebe noch seinen ursprünglichen Stoffwechsel zeigte (Tabelle 4).

Tabelle 4. Stoffwechsel von Sarkomgewebe in Normalringerlösung nach verschiedenem langem Aufenthalt in Serum und Entzündungsflüssigkeit unter aeroben Bedingungen.

| | Aus Serum | | Aus Entzündungsflüssigkeit | |
|----------------------|-----------|---------------|----------------------------|---------------|
| | Q_{O_2} | $Q_{O_2}^{M}$ | Q_{O_2} | $Q_{O_2}^{M}$ |
| I | | | | |
| 0 Stunden | 10,8 | 23,4 | 11,2 | 21,8 |
| 6 Stunden | 10,2 | 21,8 | 6,9 | 13,3 |
| 10 Stunden | 9,7 | 18,9 | 2,8 | 2,9 |
| 14 Stunden | 9,6 | 17,5 | 0 | 0 |
| II | | | | |
| 0 Stunden | 11,3 | 17,6 | 12,0 | 21,1 |
| 12 Stunden | 8,8 | 16,6 | 0 | 0 |

Wie aus der Tabelle ersichtlich, ist also die „Entzündung“ durch Veränderung der physikalisch-chemischen Zusammensetzung des entzündlichen Milieus: minimaler Zucker-gehalt, verminderte Bicarbonat- und erhöhte Wasserstoffionen-konzentration, imstande, auch bei optimaler Sauerstoff-sättigung der Entzündungsflüssigkeit innerhalb von 14 Stun-

den das Gewebe maligner Tumoren abzutöten. Das Tumorgewebe hat nicht die Fähigkeit, im Milieu der Entzündung von seiner Fett- und Eiweißatmung zu leben.

Der Austausch zwischen Entzündungsraum und normalem Gewebe ist aber auch in bezug auf Sauerstoff sehr gering. KEMPNER und PESCHEL fanden in der Entzündungsflüssigkeit als Minimalwert $\frac{1}{20}$ der Sauerstoffsättigung normaler Gewebe, als Durchschnitt in Blasenflüssigkeit nach über 50stündiger Entzündungsdauer einen Sauerstoffdruck von 21 mm Hg, entsprechend einer Sauerstoffsättigung von 2,8 %.

Bekanntlich ist die Zellatmung unabhängig vom Sauerstoffdruck, und noch bei einem Sauerstoffdruck von 10^{-5} Atmosphären hat WARBURG¹⁰ an isolierten Zellen, Kulturen von *Micrococcus candidans*, die gleiche Größe der Atmung gefunden wie bei maximaler Sauerstoffsättigung. Deshalb haben auch KEMPNER und PESCHEL betont, daß im Entzündungsraum eine Anaerobiose im strengen Sinne nicht besteht. Bei Tumorgewebe aber handelt es sich nicht um isolierte Zellen, deren Oberfläche bei optimaler Bewegung der umspülenden Flüssigkeit stets mit neuem Sauerstoff gleicher Konzentration in Berührung kommt, sondern um feste Gefüge von Zellen, an die der Sauerstoff größtenteils nur mittelbar durch die Gewebsflüssigkeit herangetragen wird. Der Sauerstoffgehalt an der Oberfläche der einzelnen Gewebszellen ist also abhängig von der Geschwindigkeit des Zustroms und der Sauerstoffsättigung der zuströmenden Flüssigkeit.

Im Milieu der Entzündung ist sowohl die Geschwindigkeit des Saftzustroms sehr vermindert als auch die Sauerstoffsättigung der zuströmenden Flüssigkeit minimal, so daß der Sauerstoffgehalt an der Oberfläche der einzelnen Zellen praktisch gleich Null wird und innerhalb des Entzündungsraumes für das von den Entzündungszellen eingeschlossene, mit den normalen Körperzellen nicht mehr verbundene Gewebe eine totale Anaerobiose anzunehmen wäre.

Um die in vivo gefundenen Bedingungen der Entzündung nachzuahmen, wurde die entzündliche Flüssigkeit mit einem Gasgemisch von 3 % O_2 gesättigt und bei diesem konstant gehaltenen Sauerstoffdruck der Stoffwechsel von Tumorgewebe in Entzündungsflüssigkeit untersucht (Tabelle 5 und 6).

Wie die Tabelle zeigt, ist bei der Sauerstoffkonzentration von 3 % trotz optimaler Grenzschnittdicke des Tumor-

Tabelle 5.

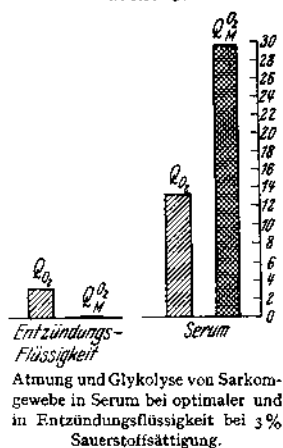


Tabelle 6. Stoffwechsel von Rattensarkomgewebe in Serum und Entzündungsflüssigkeit bei 3% Sauerstoffsättigung.

| Flüssigkeit | Zucker- gehalt mg% | Bicarbonat- gehalt mol. | O ₂ -Druck % | CO ₂ -Druck % | p _H | Q _{O₂} (Atmung) cmm Sauerstoff mg Gewebe · Stunden | Q _M ^{O₂} (Aerobe Glykolyse) cmm Milchsäure mg Gewebe · Stunden |
|--|--------------------------|-------------------------------|----------------------------|-----------------------------|----------------|---|--|
| 1. Serum | 100 | 25 · 10 ⁻³ | 95 | 5 | 7,48 | 13,2 | 30,2 |
| Entzündungsflüssigkeit (Blasenflüssigkeit) | 22 | 11,6 · 10 ⁻³ | 3 | 10 | 6,85 | 3,3 | 0,2 |
| 2. Serum | 100 | 25 · 10 ⁻³ | 95 | 5 | 7,48 | 4,9 | 18,5 |
| Entzündungsflüssigkeit (Blasenflüssigkeit) | 12 | 10,6 · 10 ⁻³ | 3 | 10 | 6,81 | 1,1 | 1,7 |
| 3. Serum | 100 | 25 · 10 ⁻³ | 95 | 5 | 7,48 | 14,7 | 24,4 |
| Entzündungsflüssigkeit (Blasenflüssigkeit) | 7 | 15,5 · 10 ⁻³ | 3 | 10 | 6,96 | 4,8 | 1,6 |
| 4. Serum | 100 | 25 · 10 ⁻³ | 95 | 5 | 7,48 | 14,1 | 18,7 |
| Entzündungsflüssigkeit (Blasenflüssigkeit) | 39 | 20,8 · 10 ⁻³ | 3 | 10 | 7,09 | 4,4 | 10,1 |
| 5. Serum | 100 | 25 · 10 ⁻³ | 95 | 5 | 7,48 | 12,9 | 20,7 |
| Entzündungsflüssigkeit (Blasenflüssigkeit) | 26 | 16,2 · 10 ⁻³ | 3 | 10 | 6,98 | 4,3 | 9,9 |

— IO —

gewebes bei einer Schüttelgeschwindigkeit von 120 Schwingungen in der Minute die Atmung fast völlig aufgehoben, die Glykolyse gegenüber der Glykolyse im Serum sehr vermindert. Der Sauerstoffgehalt von 3 % reicht also unter den gegebenen Bedingungen für die Atmung von Tumorschnitten nicht mehr aus.

Es bestand die Frage: Wie lange kann Tumorgewebe unter diesen praktisch anaeroben Verhältnissen im entzündlichen Milieu leben? Schnitte von Rattensarkom wurden nach 6- und 10stündigem Aufenthalt in mit 3 % O_2 gesättigter Entzündungsflüssigkeit wieder in Serum gebracht und ihr Stoffwechsel unter optimalen Bedingungen gemessen. Nach 6stündiger Einwirkung der entzündlichen Flüssigkeit war der Stoffwechsel stark vermindert, bei einer Einwirkung der entzündlichen Flüssigkeit von 10 Stunden gleich Null. Das heißt: das Tumorgewebe war unter den Bedingungen der Entzündung innerhalb von 10 Stunden abgestorben, während das in Serum unter konstanten Bedingungen gehaltene Tumorgewebe noch seinen ursprünglichen Stoffwechsel zeigte (Tabelle 7).

Tabelle 7. Stoffwechsel von Sarkomgewebe in Normalringerlösung nach verschieden langem Aufenthalt in Serum unter normalen und in Entzündungsflüssigkeit unter anaeroben Bedingungen.

| | Aus Serum | | Aus Entzündungsflüssigkeit | |
|----------------------|-----------|-------------|----------------------------|-------------|
| | Q_{O_2} | $Q_{O_2}^M$ | Q_{O_2} | $Q_{O_2}^M$ |
| I | | | | |
| 0 Stunden | 10,8 | 23,4 | 10,9 | 20,1 |
| 6 Stunden | 10,2 | 21,8 | 2,9 | 3,0 |
| 10 Stunden | 9,7 | 18,9 | 0 | 0 |
| II | | | | |
| 0 Stunden | 11,3 | 17,6 | 9,4 | 19,7 |
| 12 Stunden | 8,8 | 16,6 | 0 | 0 |

V. Hypothese über Entstehung und Behandlungsmöglichkeiten von Tumoren.

Wie die Versuche zeigen, sind die durch den Stoffwechsel der entzündlichen Zellen bedingten „unspezifischen“ Reaktionen der Entzündung: Sauerstoff-, Zucker-, Bicarbonatmangel, saures Milieu, imstande, innerhalb von 10–14 Stunden Tumorgewebe zu zerstören. Die Fähigkeit zur Entzündung aber hängt ab vom jeweiligen Gesundheitszustand des Gesamtorganismus und der einzelnen Organe und wird geringer mit zunehmendem Alter. Zur Entstehung eines Krebses bedarf es deshalb nicht nur der einen „böartig degenerierten“ Zelle, der sozusagen alle übrigen Körperzellen bedingungslos preisgegeben sind, sondern eines krankhaften Zustandes:

— II —

der Unfähigkeit der Gewebe zur Entzündung. Die Geschwindigkeit des Tumorwachstums ist also bestimmt durch
Menge der degenerierten Zellen

das Verhältnis Entzündungsfähigkeit des betroffenen Gewebes, wobei unter Entzündungsfähigkeit nicht nur die *Stärke* einer Entzündung zu verstehen ist, sondern auch die zur Auslösung einer Entzündung notwendige *Empfindlichkeit* für jede minimale Veränderung im normalen Gewebe, sei diese bedingt durch mechanische Verletzung, Bakterien oder degenerierte Zellen oder durch irgendeine Schädlichkeit, die gleichzeitig eine Zelldegeneration verursacht. So können für die Krebsentstehung gerade die schwächsten Reize die gefährlichsten werden (man denke an das Lippenkarzinom nach langjährigem Tragen einer Tabakspfeife), indem eine geringe Schädlichkeit zwar die bösartige Zelldegeneration hervorruft, nicht aber — bei verminderter Reizempfindlichkeit des betroffenen Gewebes — ausreichende Abwehrreaktionen der Entzündung.

Für die Verhütung und Behandlung der Geschwülste wäre also die ideale Aufgabe — ohne vorschnelle Illusionen therapeutischer Verwirklichung —: nicht nur die Schädlichkeiten fernzuhalten, die eine Degeneration von Körperzellen verursachen können, und die degenerierten Zellen zu vernichten durch Messer, Radium oder irgendwelche tumorspezifischen Substanzen, sondern die Entzündungsfähigkeit des Körpers zu *erhalten*, so daß jede degenerierende Zelle gewissermaßen schon bei ihrem Entstehen durch Absperrung, Aushungerung und Säure zerstört wird, und die degenerierten Zellen zu bekämpfen durch maximale *Steigerung* der Entzündungsfähigkeit und Mobilisierung dieser gesteigerten Entzündungsreaktionen auf das angegriffene Gewebe.

Literatur: ¹ WARBURG, Stoffwechsel der Tumoren. Berlin 1926. — ² SILBERSTEIN, Wien. klin. Wschr. 1925, 356. — ³ v. WITZLEBEN, Klin. Wschr. 1925, 2125. — ⁴ RONDONI, Klin. Wschr. 1926, 465. — ⁵ WARBURG, Stoffwechsel der Tumoren. Berlin: Julius Springer 1926. — ⁶ FISCHER-WASELS, Frankf. Z. Path. 39, H. 1/3 (1930). — ⁷ FEHLEISEN, Die Ätiologie des Erysipels. Berlin 1883. — ⁸ LUMSDEN, Arch. exper. Zellforschg 6, 206 (1928). — ⁹ KEMPNER u. PESCHEL, Z. klin. Med. 114, H. 4/5 (1930). — ¹⁰ WARBURG, Biochem. Z. 214, H. 1/3.

***Wirkung von Blausäure und Kohlenoxyd
auf die Buttersäuregärung
[Effect of Cyanide and Carbon Monoxide
on Butyric Acid Fermentation]***

Effect of Cyanide and Carbon Monoxide on Butyric Acid Fermentation by Walter Kempner

As Warburg has found, respiration of animal body cells and of most bacteria ceases in the presence of carbon monoxide (CO) and begins again when the CO is removed. Carbon monoxide thus displaces the oxygen from its bond with the respiratory enzyme and itself forms a reversible bond with the respiratory enzyme. This discovery of a reversible bond between CO and the respiratory enzyme confirms the heavy-metal theory of respiration: since only heavy metals can bond with CO at normal temperature, the respiratory enzyme must be a heavy-metal compound and respiration is catalyzed by heavy metal.

The tests showed that the fermentation of butyric acid, like respiration, ceases in the presence of CO and begins anew after removal of the CO, that is, this fermentation enzyme, like the respiratory enzyme, enters into a reversible bond with CO. The enzyme of butyric acid fermentation is thus a heavy-metal compound, like the respiratory enzyme, and fermentation of butyric acid is a heavy-metal catalysis.

The fermentation of butyric acid is essentially independent of the concentration of sugar in the nutrient fluid. Even at a sugar content of 3 mg in 100 cc of Ringer's solution, the fermentation rate was not less than at a sugar concentration of 300 mg in 100 cc of Ringer's solution.

Respiration, fermentation of lactic acid, alcoholic fermentation, and decomposition of hydrogen peroxide in living cells are reversibly inhibited by cyanide, just like other heavy-metal catalyses; for example, copper catalysis of cysteine or the platinum catalysis of hydrogen peroxide.

The importance of CO in biology was recognized in the middle of the last century, when Claude Bernard discovered that it makes a reversible bond with hemoglobin, in which the CO displaces the oxygen from the iron of hemoglobin and thus destroys the function of blood as an oxygen carrier. Since that time, CO had been viewed as a blood toxin only, because its effects had never been demonstrated on any organic substance other than hemoglobin. In 1926, however, Warburg discovered that the respiratory enzyme also reacts with CO, just like hemoglobin and other heavy metals.

In all previously described cases of reversible photochemical CO cleavage, we are dealing with iron compounds of CO. However, the CO compounds of the other heavy metals were resistant to light. In contrast to the CO compound of the respiration enzyme, the CO compound of the fermentation enzyme is likewise resistant to light, thus its photochemical behavior is not the same as an iron compound, but rather it acts like a compound with a different heavy metal. Accordingly, the butyric acid fermentation would not be an iron catalysis, but rather the catalysis of another heavy

metal, such as copper or a metal of the iron *group*.

If we agree with Pasteur that fermentation is an intra-molecular respiration, then it is inherently likely that fermentation is also a heavy-metal catalysis. Then the enzyme, like the respiratory enzyme, would have to react with CO. But no such compound of CO with the enzyme has yet been found. Carbon monoxide has not been observed to influence the fermentation of either lactic acid or alcohol, even at a CO pressure of 60 atm. The heavy-metal theory of fermentation was supported, however, by the fact that the enzyme forms a dissociating compound with cyanide similar to the respiratory enzyme, although the cyanide sensitivity of both lactic acid fermentation and alcoholic fermentation is 10 to 100 times less than the sensitivity of respiration.

Biochemische Zeitschrift

Unter Mitwirkung von

E. Abderhalden-Halle a. S., M. Ascoli-Palermo, L. Asher-Bern, A. Bach-Moskau, G. Barger-Edinburgh, M. Bergmann-Dresden, G. Bertrand-Paris, A. Bickel-Berlin, F. Blumenthal-Berlin, Fr. Boas-München, A. Bonanni-Rom, F. Bottazzi-Neapel, G. Bredig-Karlsruhe i. B., Wl. Butkewitsch-Moskau, M. Cremer-Berlin, R. Doerr-Basel, A. Durig-Wien, R. Ege-Kopenhagen, F. Ehrlich-Breslau, H. v. Euler-Stockholm, S. Flexner-New York, A. Fodor-Jerusalem, J. Forsman-Lund, S. Fränkel-Wien, E. Freund-Wien, H. Freundlich-Berlin, E. Friedmann-Moskau, O. Fürth-Wien, F. Haber-Berlin, M. Hahn-Berlin, E. Hammarsten-Stockholm, P. Härtl-Budapest, F. Heyduck-Berlin, E. Hägglund-Stockholm, V. Henri-Zürich, V. Henriques-Kopenhagen, R. O. Herzog-Berlin, K. Hess-Berlin, W. Heubner-Berlin, R. Höber-Kiel, P. Karrer-Zürich, B. Kisch-Köln, G. Klein-Heidelberg, W. Klein-Bonn, A. J. Kluyver-Delft, M. Kochmann-Halle a. S., R. Krimberg-Riga, F. Landolf-Buenos Aires, L. Langstein-Berlin, E. Laqueur-Amsterdam, O. Lemmermann-Berlin, P. A. Levene-New York, S. Loewe-Mannheim, A. Loewy-Davos, H. Lüers-München, Th. Madsen-Kopenhagen, A. Magnus-Levy-Berlin, E. Mangold-Berlin, L. Marchlewski-Krakau, P. Mayer-Karlsbad, A. McKenzie-Dundee, J. Meisenheimer-Tübingen, Kurt H. Meyer-Gent, O. Meyerhof-Heidelberg, I. Michaelis-New York, H. Molisch-Wien, W. Nernst-Berlin, K. Noack-Berlin, C. v. Noorden-Wien, Orla-Jensen-Kopenhagen, W. Ostwald-Leipzig, A. Palladin-Charkow, J. K. Parnas-Lemberg, W. Paull-Wien, W. H. Peterson-Madison, R. Pfeiffer-Breslau, E. P. Pick-Wien, L. Pincussen-Berlin, J. Pohl-Hamburg, Ch. Porcher-Paris, D. N. Prianitschnikow-Moskau, H. Pringsheim-Berlin, A. Rippel-Göttingen, P. Rona-Berlin, H. Sachs-Heidelberg, T. Sasaki-Tokio, B. Sbarsky-Moskau, A. Scheunert-Leipzig, E. Schmitz-Breslau, J. Snapper-Amsterdam, S. P. L. Sörensen-Kopenhagen, J. Stoklasa-Prag, W. Straub-München, H. Steenbock-Madison, K. Suto-Kanazawa, U. Suzuki-Tokio, K. Thomas-Leipzig, F. Verzár-Basel, A. I. Virtanen-Helsingfors, O. Warburg-Berlin, H. J. Waterman-Delft, G. v. Wendt-Helsingfors, E. Widmark-Lund, A. Wohl-Danzig, J. Wohlgemuth-Berlin, N. Zelnisky-Moskau

herausgegeben von

C. Neuberg, Berlin-Dahlem

unter redaktioneller Mitarbeit von **M. Jacoby-Berlin**

Sonderabdruck aus 257. Band, 1.—3. Heft

Walter Kempner:

**Wirkung von Blausäure und Kohlenoxyd
auf die Buttersäuregärung**



Berlin
Verlag von Julius Springer
1933

**Wirkung
von Blausäure und Kohlenoxyd auf die Buttersäuregärung¹.**

Von
Walter Kempner.

(Aus der II. Medizinischen Klinik der Charité Berlin.)

(Eingegangen am 31. Oktober 1932.)

Wie Warburg gefunden hat, hört die Atmung der tierischen Körperzellen und der meisten Bakterien auf bei Gegenwart von Kohlenoxyd und beginnt wieder, wenn das Kohlenoxyd entfernt ist (1). Das Kohlenoxyd verdrängt also den Sauerstoff aus seiner Verbindung mit dem Atmungsferment und bildet selber mit dem Atmungsferment eine reversible Verbindung. Durch diese Entdeckung einer reversiblen Atmungsferment-Kohlenoxydverbindung war endgültig die Schwermetalltheorie der Atmung bewiesen; denn nur Schwermetalle können sich bei gewöhnlicher Temperatur mit Kohlenoxyd verbinden: Das Atmungsferment ist also eine Schwermetallverbindung, die Atmung eine Schwermetallkatalyse.

Betrachtet man nach Pasteur die Gärung als eine innermolekulare Atmung, so ist von vornherein wahrscheinlich, daß es sich auch bei der Gärung um eine Schwermetallkatalyse handelt. Dann müßte das Gärungsferment, ebenso wie das Atmungsferment, mit Kohlenoxyd reagieren. Eine solche Verbindung des Kohlenoxyds mit dem Gärungsferment konnte aber bisher nicht gefunden werden: Weder bei der Milchsäuregärung noch bei der alkoholischen Gärung gelang eine Beeinflussung durch Kohlenoxyd, selbst nicht bei einem Kohlenoxyddruck von 60 Atm. (2). Doch wurde die Schwermetalltheorie der Gärung gestützt durch die Tatsache, daß das Gärungsferment ähnlich wie das Atmungsferment eine dissoziierende Verbindung mit Blausäure

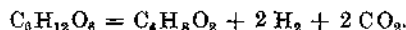
¹ Ausgeführt mit Unterstützung der Notgemeinschaft der Deutschen Wissenschaft.

bildet, allerdings war die Empfindlichkeit sowohl der Milchsäuregärung wie der alkoholischen Gärung gegen Blausäure 10- bis 100mal geringer als die Empfindlichkeit der Atmung (3).

Wir haben bei Untersuchungen über den Stoffwechsel von Buttersäurebakterien gefunden, daß die Buttersäuregärung durch Blausäure in demselben Maße gehemmt wird wie die Atmung, also wesentlich empfindlicher ist gegen Blausäure als die alkoholische Gärung und die Milchsäuregärung. Nach diesem Befund war es wahrscheinlich, daß auch gegenüber Kohlenoxyd das Ferment der Buttersäuregärung sich anders verhalte als die bisher untersuchten Gärungsfermente. Tatsächlich zeigten die Versuche, daß die Buttersäuregärung ebenso wie die Atmung bei Gegenwart von Kohlenoxyd aufhört und nach Entfernung des Kohlenoxyds wieder beginnt, daß also dies Gärungsferment ebenso wie das Atmungsferment eine reversible Verbindung mit Kohlenoxyd eingeht. Das Ferment der Buttersäuregärung ist also ebenso wie das Atmungsferment eine Schwermetallverbindung, die Buttersäuregärung eine Schwermetallkatalyse.

I. Stoffwechsel des Buttersäurebazillus.

Der Zucker wird zu Buttersäure gespalten nach der Gleichung



Als Versuchsmaterial dienten 20 Stunden alte, bei 37° C anaerob in Zuckerbouillon gezüchtete Kulturen von *Clostridium butyricum*. Die Kulturen wurden zentrifugiert, das Zentrifugat in Ringerlösung gewaschen, in Ringer-Zucker-Phosphat- oder Ringer-Zucker-Bicarbonat-Lösung suspendiert. Versuchsflüssigkeit und Versuchsgefäß wurden mit Wasserstoff, Stickstoff oder Kohlensäure oder entsprechenden Gasgemischen gesättigt, und der Stoffwechsel anaerob nach den von Warburg angegebenen Methoden an der Gasbildung (Wasserstoff- und Kohlensäurebildung) der Bakterien gemessen. (Näheres s. Abschnitt: Methodik und Protokolle.) Nach der manometrischen Messung wurden die Zellen zur Gewichtsbestimmung (4) abzentrifugiert und in der zellfreien Versuchsflüssigkeit der Zuckerverbrauch nach Hagedorn-Jensen bestimmt.

Die gesamte Gasbildung von 1 mg Buttersäurebakterien in Ringer-Zucker-Phosphat bei 37° C in 1 Stunde beträgt beispielsweise 80 cmm. Bestimmt man die Mengenanteile von Wasserstoff und Kohlensäure, indem man die Kohlensäure durch Kalilauge, den Wasserstoff durch Palladium absorbiert, so ergibt sich, daß die gebildete Gasmenge zu gleichen Teilen aus Kohlensäure und Wasserstoff besteht (Tabelle I). Das entspricht den nach der obigen Gleichung zu erwartenden Verhältnissen: Die Buttersäure bleibt in der Flüssigkeit und verbindet sich mit den Puffersubstanzen, im Gasraum erscheinen zu gleichen Teilen Wasserstoff und Kohlensäure.

Wirkung von Blausäure und Kohlenoxyd auf die Buttersäuregärung. 43

Tabelle I.

Gasbildung (in Stickstoff bei Phosphatpufferung) durch 1 mg Buttersäurebakterien in 1 Stunde.

| | I Gesamte Gasentwicklung cmm | II Gasentwicklung bei Absorption des Wasserstoffs durch Palladium cmm | III Gasentwicklung bei Absorption der Kohlensäure durch Kalilauge cmm |
|---|------------------------------------|---|---|
| 1 | 72,0 | 36,0 | 36,2 |
| 2 | 85,2 | 42,6 | 42,0 |

Ersetzt man das Phosphatgemisch durch das Puffersystem Bicarbonat-Kohlensäure, so treibt die Buttersäure aus dem Natriumbicarbonat unter Bildung von Natriumbutyrat Kohlensäure aus, und zwar so viel, daß die Gesamtgasproduktion um ein Viertel, die Kohlensäureproduktion um die Hälfte zunimmt (Tabelle II und Protokoll 1).

Tabelle II.

Gasbildung durch 1 mg Buttersäurebakterien in 1 Stunde im Phosphat- und im Bicarbonatmedium.

| | Phosphatmedium (p_H 6,4) | | | Bicarbonatmedium (p_H 6,4) | | |
|---|--------------------------------|---------------------------------|----------------------------------|--------------------------------|---------------------------------|----------------------------------|
| | I Gesamte Gasbildung cmm | II Kohlensäurebildung cmm | III Wasserstoffbildung cmm | I Gesamte Gasbildung cmm | II Kohlensäurebildung cmm | III Wasserstoffbildung cmm |
| 1 | 94 | 47 | 46 | 118 | 71 | 47 |
| 2 | 104 | 52 | 53 | 130 | 79 | 51 |

Die Bicarbonatabnahme entspricht dann einem Fünftel der gesamten Gasbildung (Tabelle III).

Tabelle III.

Gasbildung und Bicarbonatverbrauch durch 1 mg Buttersäurebakterien in 1 Stunde.

| | Gesamte Gasbildung im Bicarbonatmedium cmm | Daraus errechneter Bicarbonatverbrauch cmm | Durch Bicarbonatbestimmungen gemessener Bicarbonatverbrauch cmm |
|---|---|---|--|
| 1 | 96 | 19,2 | 18,5 |
| 2 | 86 | 17,2 | 16,7 |

Für 1 Molekül verbrauchten Zuckers entstehen also im Phosphatmedium 4 Moleküle Gas ($2\text{ CO}_2 + 2\text{ H}_2$), im Bicarbonatmedium 5 Moleküle Gas ($3\text{ CO}_2 + 2\text{ H}_2$) (Tabelle IV).

Tabelle IV.

Gasbildung und Zuckerverbrauch durch 1 mg Buttersäurebakterien in 1 Stunde in Phosphat- und Bicarbonatmedium.

| Zuckerverbrauch (1 cmm = $8 \cdot 10^{-3}$ mg Zucker) | Gesamte Gasbildung im Phosphatmedium (4 cmm = 2 cmm $\text{CO}_2 + 2 \text{ cmm H}_2 = 3,9 \cdot 10^{-3}$ mg Buttersäure) | Gesamte Gasbildung im Bicarbonatmedium (5 cmm = 3 cmm $\text{CO}_2 + 2 \text{ cmm H}_2$ = $3,9 \cdot 10^{-3}$ mg Buttersäure) |
|--|---|---|
| cmm | cmm | cmm |
| 24 | 94 | 118 |

Im Durchschnitt fanden wir in Ringerlösung unter optimalen Bedingungen (p_H 6,2 bis 6,8; 37°C) sowohl bei Phosphatpufferung (1 bis $3 \cdot 10^{-2}$ molar) wie bei Bicarbonatpufferung (0,2 bis $2 \cdot 10^{-2}$ molar) eine Buttersäurebildung von 25 cmm (= $9,8 \cdot 10^{-2}$ mg) für 1 mg Buttersäurebakterien (Trockengewicht) in 1 Stunde.

In Fleisch-, Serum- oder Ascitesbouillon ist der Stoffwechsel der Buttersäurebakterien beträchtlich größer als in Ringerlösung: Im Durchschnitt betrug die Buttersäurebildung von 1 mg Bakterien in 1 Stunde etwa 80 cmm (= $3,1 \cdot 10^{-1}$ mg). Doch ist für Stoffwechseluntersuchungen — wegen des Wachstums der Bakterien in Bouillon — Ringerlösung das geeignetere Medium.

Die verschiedenen Zuckerarten werden ungefähr mit gleicher Geschwindigkeit angegriffen (Tabelle V).

Tabelle V.

Einfluß verschiedener Zuckerarten auf die Buttersäuregärung.

| g Zucker in 100 ccm Ringerlösung | 0,2 g Lävulose | 0,2 g Glucose | 0,2 g Maltose | — |
|--|----------------|---------------|---------------|---|
| Durch 1 mg Bakterien in 1 Std. gebildete Buttersäure in cmm | 19 | 19 | 19 | 0 |

Von der Konzentration des Zuckers in der Nährflüssigkeit ist die Buttersäuregärung weitgehend unabhängig (Tabelle VI). Noch bei einem Zuckergehalt von 3 mg in 100 ccm Ringerlösung war die Gärungsgeschwindigkeit nicht geringer als bei einer Zuckerkonzentration von 300 mg in 100 ccm Ringerlösung.

Tabelle VI.

Einfluß der Zuckerkonzentration auf die Buttersäuregärung.

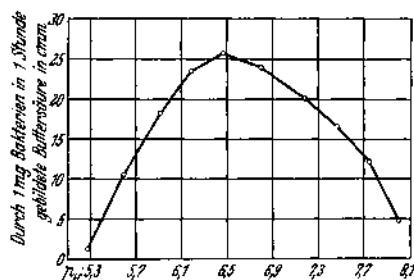
| mg Lävulose in 100 ccm Ringerlösung | 0 | 3 | 9 | 27 | 300 |
|--|---|----|----|----|------|
| Durch 1 mg Bakterien in 1 Std. gebildete Buttersäure in cmm | 0 | 19 | 20 | 19 | 19,5 |

Wirkung von Blausäure und Kohlenoxyd auf die Buttersäuregärung. 45

Die Wasserstoffionenkonzentration ist für die Buttersäuregärung optimal zwischen p_H 6 und 7 (Tabelle VII). Als Puffer dienten Phosphatgemische nach *Sørensen* in einer Phosphatkonzentration von 0,03 Mole pro Liter.

Tabelle VII.

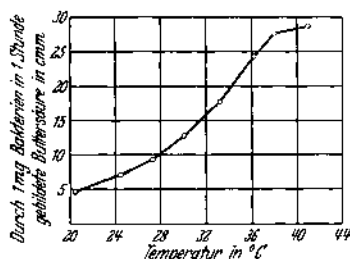
Einfluß der Wasserstoffionenkonzentration auf die Buttersäuregärung.



Den Einfluß der Temperatur zeigt Tabelle VIII.

Tabelle VIII.

Einfluß der Temperatur auf die Buttersäuregärung.



II. Wirkung der Blausäure auf die Buttersäuregärung.

Die Atmung, die Milchsäuregärung, die alkoholische Gärung, die Wasserstoffperoxydzersetzung in lebenden Zellen wird durch Blausäure reversibel gehemmt, ebenso wie andere Schwermetallkatalysen, beispielsweise die Kupferkatalyse des Cysteins oder die Platinkatalyse des Wasserstoffperoxyds. Doch ist die Empfindlichkeit der einzelnen Schwermetallkatalysen gegen Blausäure verschieden: *Warburg* fand eine Hemmung der Wasserstoffperoxydspaltung der Chlorella durch $m/200000$ HCN um 30 %, durch $m/10000$ um 83 % (5); eine Hemmung der Cysteinoxydation durch $m/2500$ HCN um 60 % (6); eine Hemmung der Atmung einiger Hefestämme durch $m/100000$ HCN um 70 %, durch $m/10000$ um 100 % (7).

Wir fanden bei anderen Hefestämmen bei $m/10000$ HCN eine Hemmung der Atmung um 40 %; bei *Bacterium coli* durch $m/10000$

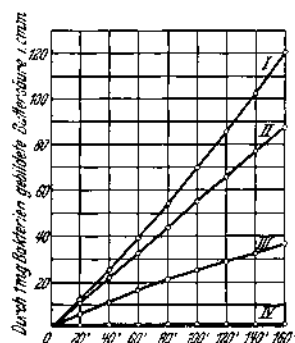
eine Hemmung um 60 %; bei *Vibrio Metschnikoff* durch $m/1000$ eine Hemmung um 80 %; bei Geflügeltuberkelbazillen durch $m/1000$ eine Hemmung um 50 %; bei *Bacillus pyocyaneus* durch $m/1000$ eine Hemmung um 45 %.

Bei allen bisher untersuchten Bakterien und Körperzellen (ausgenommen *Chlorella*, einige fakultative Anaerobier und Preßsäfte von Körperzellen) ergab sich eine spezifische Wirkung der Blausäure auf die Atmung: Beträchtliche Hemmung der Atmung durch Konzentrationen von 10^{-3} bis 10^{-4} molar HCN. Hingegen wurde eine gleich starke Hemmung der Gärung erst bei etwa 10- bis 100fach stärkeren Konzentrationen erreicht. Sowohl die alkoholische Gärung von Hefezellen und Hefepreßsäften, wie die Milchsäuregärung von Bakterien und Körperzellen wird erst durch $1 \cdot 10^{-2}$ molar Blausäure um 30 bis 50 % gehemmt.

Wie unsere Untersuchungen ergaben, wird die Buttersäuregärung ebenfalls durch Blausäure gehemmt, und zwar bereits durch wesentlich geringere Konzentrationen als die bisher untersuchten Gärungen: Schon bei einer Konzentration von $1 \cdot 10^{-4}$ molar HCN beträgt die Gärungshemmung 23 %, bei $1 \cdot 10^{-3}$ molar HCN 66 % (Tabelle IX). Die Empfindlichkeit der Buttersäuregärung gegen Blausäure ist also von derselben Größenordnung wie die der Atmung und etwa 50mal so groß wie die der Milchsäuregärung und der alkoholischen Gärung.

Tabelle IX.

Wirkung der Blausäure auf die Buttersäuregärung.



- I = Ohne HCN.
 II = $m/10000$ HCN: Hemmung der Buttersäuregärung um 23 %.
 III = $m/1000$ HCN: Hemmung der Buttersäuregärung um 66 %.
 IV = $m/100$ HCN: Hemmung der Buttersäuregärung um 100 %.

Verdünnst man die Versuchsflüssigkeit, die beispielsweise $1 \cdot 10^{-3}$ Mole/Liter Blausäure enthielt, mit Ringer-Lävulose-Phosphat um das Zehnfache, so daß die Blausäurekonzentration nur noch

Wirkung von Blausäure und Kohlenoxyd auf die Buttersäuregärung. 47

1. 10^{-4} Mole/Liter beträgt, so sinkt die Hemmung, die vorher 66 % betrug, auf 23 % der Kontrolle. Die Wirkung der Blausäure ist also reversibel (Protokoll 2).

III. Wirkung des Kohlenoxyds auf die Buttersäuregärung.

Bei gewöhnlicher Temperatur ist das Kohlenoxyd ein gegen die meisten Substanzen indifferentes Gas, welches weder durch Säuren noch durch Alkalien verändert wird. Nur mit einigen Schwermetallen kann das Kohlenoxyd bei gewöhnlicher Temperatur reagieren: z. B. verbindet es sich bei 30° mit fein verteiltem Nickel zu Kohlenoxydnickel ($\text{Ni} + 4 \text{CO} = \text{Ni}(\text{CO})_4$), mit fein verteiltem Eisen bei niedriger Temperatur zu Eisenpentacarbonyl ($\text{Fe} + 5 \text{CO} = \text{Fe}(\text{CO})_5$). Auch Chrom-, Kobalt-, Ruthenium- und Kupfercarbonyle sind bekannt, eine Kohlenoxydverbindung des Mangans hingegen noch nicht.

Für die Biologie wurde das Kohlenoxyd wichtig, als *Claude Bernard* in der Mitte des vorigen Jahrhunderts entdeckte, daß Kohlenoxyd mit dem Hämoglobin eine reversible Verbindung eingeht, bei der das Kohlenoxyd den Sauerstoff von dem Eisen des Hämoglobins verdrängt und dadurch das Blut seiner Funktion als Sauerstoffüberträger beraubt. Seit dieser Zeit galt das Kohlenoxyd als reines Blutgift, da es niemals gelungen war, eine Wirkung des Kohlenoxyds auf eine andere organische Substanz als auf das Hämoglobin nachzuweisen, bis *Warburg* 1926 entdeckte, daß auch das Atmungsferment mit dem Kohlenoxyd reagiere, ebenso wie das Hämoglobin und andere Schwermetalle.

Läßt man auf atmende Zellen an Stelle eines Sauerstoff-Stickstoffgemisches ein Sauerstoff-Kohlenoxydgemisch einwirken, so hört die Atmung auf. Die Größe der Atmungshemmung ist abhängig vom Kohlenoxyddruck, der etwa 1 Atm. betragen muß, und vom Sauerstoffdruck. Je niedriger der Sauerstoffdruck, um so größer ist bei gleichem Kohlenoxyddruck die Hemmung der Atmung. Diese Atmungshemmung durch Kohlenoxyd ist vollständig reversibel.

Da nur Schwermetalle bei gewöhnlicher Temperatur mit Kohlenoxyd reagieren, war durch diese Entdeckung die chemische Konstitution des Atmungsferments als Schwermetallverbindung bewiesen. „Um dieses Schwermetall konkurrieren in Kohlenoxyd-Sauerstoffgemischen das Kohlenoxyd und der Atmungssauerstoff. Wie Kohlenoxyd den Sauerstoff von dem Eisen des Hämoglobins verdrängt, so verdrängt Kohlenoxyd den Atmungssauerstoff von dem Metall des Atmungsferments und macht dadurch das Metall des Ferments unfähig zur Sauerstoffübertragung“ [*Warburg* (8)].

Seit dieser Entdeckung einer Kohlenoxydverbindung des Atmungsferments versuchte man eine Kohlenoxydverbindung des Gärungsferments zu finden, um — nach der *Pasteurschen* Vorstellung von der

Ähnlichkeit beider Fermente — auch für das Gärungsferment den Schwermetallcharakter zu erweisen. Aber es gelang weder die alkoholische Gärung noch die Milchsäuregärung durch Kohlenoxyd zu beeinflussen, selbst nicht durch einen Kohlenoxyddruck von 60 Atm.

Da die Buttersäuregärung, wie im vorigen Abschnitt beschrieben, sich gegen Blausäure anders verhielt als die alkoholische Gärung und die Milchsäuregärung, und sich ebenso empfindlich zeigte wie die Atmung, erschien es nicht aussichtslos, zu untersuchen, ob sich diese Gärung vielleicht auch dem Kohlenoxyd gegenüber anders verhielte als die genannten Gärungen und etwa ebenso wie die Atmung.

Sättigt man das Versuchsgefäß anstatt mit Wasserstoff oder Stickstoff mit Kohlenoxyd, so daß entsprechend dem Kohlenoxyddruck von 760 mm Hg und dem *Bunsenschen* Absorptionskoeffizienten des CO für die Versuchstemperatur von 37° C (0,018) die Kohlenoxydkonzentration der Versuchsflüssigkeit $8 \cdot 10^{-4}$ Mole/Liter beträgt, und mißt den Stoffwechsel in Ringer-Phosphatlösung unter den für die Buttersäuregärung gefundenen optimalen Bedingungen, so ergibt sich: Die Bildung von Kohlensäure und Wasserstoff beträgt in Stickstoff je 40 cmm, in Kohlenoxyd je 6 cmm. Der Zuckerverbrauch beträgt in Stickstoff 20 cmm, in Kohlenoxyd 3 cmm. Die Buttersäuregärung wird also durch $8 \cdot 10^{-4}$ molar CO bei 37° C um 85 % gehemmt (Tabelle X und Protokoll 4). Die Hemmung der Buttersäuregärung durch Kohlenoxyd ist von derselben Größenordnung wie die Kohlenoxydhemmung der Atmung.

Tabelle X.

Gasbildung und Zuckerverbrauch durch 1 mg Buttersäurebakterien in 1 Stunde in Wasserstoff und in Kohlenoxyd.

| | In H ₂ | In CO |
|---|-------------------|--------|
| Gasbildung (4 cmm = $3,9 \cdot 10^{-3}$ mg Buttersäure) . . | 80 cmm | 12 cmm |
| Zuckerverbrauch (1 cmm = $8 \cdot 10^{-3}$ mg Zucker) . . | 20 „ | 3 „ |

Ersetzt man das Kohlenoxyd im Versuchsgefäß durch Wasserstoff oder Stickstoff, so wird der Stoffwechsel, der vorher durch Kohlenoxyd um 85 % gehemmt war, genau so groß, wie der Stoffwechsel der von Anfang an mit Wasserstoff oder Stickstoff gesättigten Kontrolle (Protokoll 3). Die Hemmung der Buttersäuregärung durch Kohlenoxyd ist also wie die Hemmung der Atmung vollständig reversibel.

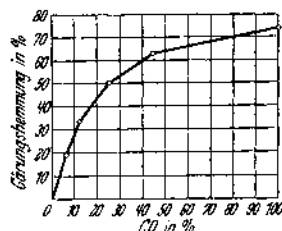
Die Wirkung verschieden starker Kohlenoxydkonzentrationen zeigt Tabelle XI. Schon bei einem Kohlenoxyddruck von 10 % beträgt die Gärungshemmung 30 %, bei einem Kohlenoxyddruck von 50 % beträgt die Hemmung 62 %. Kohlenoxyd wirkt also auf die Buttersäuregärung in der gleichen Konzentration wie Blausäure: Durch

Wirkung von Blausäure und Kohlenoxyd auf die Buttersäuregärung. 49

$3 \cdot 10^{-4}$ molar Kohlenoxyd ebenso wie durch $3 \cdot 10^{-4}$ molar Blausäure wird die Gärung um 50 % gehemmt.

Tabelle XI.

Wirkung des Kohlenoxyds auf die Buttersäuregärung.



IV. Kohlenoxydhemmung der Buttersäuregärung bei Belichtung.

Mond und Langer fanden 1891, daß Eisenpentacarbonyl bei Belichtung Kohlenoxyd abspaltet (9); im Gegensatz zu Eisenpentacarbonyl war Nickelcarbonyl, wie Dewar fand, nicht lichtempfindlich (10). Die Lichtempfindlichkeit war spezifisch für die Kohlenoxydverbindung des Eisens. 1896 entdeckte Haldane die Lichtempfindlichkeit der Kohlenoxydverbindung des Hämoglobins, also ebenfalls einer Eisenverbindung (11). Kohlenoxydhämoglobin zerfällt bei Belichtung in Kohlenoxyd und Hämoglobin. Auch Kohlenoxyd-Pyridin-Hämochromogen (12) und Kohlenoxyd-Ferro-Cystein (13) werden durch Licht gespalten.

Wie die genannten Eisen-Kohlenoxydverbindungen dissoziiert auch die Kohlenoxydverbindung des Atmungsferments bei Belichtung (1). Der Katalysator der Atmung ist also — wie Warburg durch diese Entdeckung bewies — eine Eisenverbindung. Die Lichtempfindlichkeit dieser Atmungsferment-Kohlenoxydverbindung ist so groß, daß die durch Kohlenoxyd bewirkte Hemmung der Atmung schon bei Belichtung mit geringer Lichtstärke zum größten Teile verschwindet. Belichtet man beispielsweise mit einer $\frac{1}{2}$ -Watt-Metallfadenlampe von 75 Watt Stromverbrauch, deren leuchtender Faden 4 cm vom Boden des Versuchsgefäßes entfernt ist, so sinkt die Hemmung der Atmung, die im Dunkeln 70 % betrug, auf 14 %.

Nach diesen Befunden lag es nahe zu versuchen, ob die Kohlenoxydverbindung des Gärungsferments der Buttersäuregärung ebenfalls bei Belichtung dissoziiert. Da sich eine Metallfadenlampe von 150 Kerzen, 4 cm vom Boden des Versuchsgefäßes entfernt, als unwirksam erwies, wurde als Lichtquelle eine Zeiss'sche Bogenlampe mit 30 Amp.-Kohlen verwendet, deren Strahlung durch einen wassergekühlten Doppelkondensor konzentriert wurde.

Das Versuchsgefäß wurde in einem Glasklimatestaten an der Stelle der stärksten Einengung des Strahlenganges geschüttelt. Die Beleuchtungsstärke betrug am Ort der Einwirkung der Strahlen ungefähr

1 Million Hefner-Lux¹. Die Beleuchtungszeit war 10 bis 60 Minuten. Die Zellmenge in der Flüssigkeit war möglichst gering und betrug nicht mehr als 1 mg Trockensubstanz in 1 ccm.

Bei dieser Lichtintensität fanden wir keinerlei Beeinflussung der Kohlenoxydwirkung (Protokoll 5), auch nicht bei Variierungen des Kohlenoxyddruckes, der Bakterienkonzentration und der Temperatur. Auch die Bestrahlung mit ultravioletem Licht (Hanauer Quecksilberdampfampe) in Quarzgefäßen war ohne jeden Einfluß auf die Kohlenoxydwirkung. Die Gärungshemmung war in dem bestrahlten Gefäß sowohl während wie nach der Bestrahlung ebenso groß wie in dem unbestrahlten Versuchsgefäß.

In allen bisher beschriebenen Fällen von reversibler photochemischer Kohlenoxydabspaltung handelt es sich um Eisenverbindungen des Kohlenoxyds. Hingegen waren die Kohlenoxydverbindungen der anderen Schwermetalle am Licht beständig. Im Gegensatz zu der Kohlenoxydverbindung des Atmungsferments ist die Kohlenoxydverbindung des Gärungsferments ebenfalls am Licht beständig, sie verhält sich also photochemisch nicht wie eine Eisenverbindung, sondern wie eine Verbindung mit einem *anderen* Schwermetall. Danach würde es sich bei der Buttersäuregärung nicht um eine Eisenkatalyse handeln, sondern um die Katalyse eines anderen Schwermetalls, vielleicht eines Metalls der Eisengruppe, oder des Kupfers. Daß diese Metalle ebenso wie das Eisen eine große katalytische Wirksamkeit besitzen, ist bekannt durch ihre Verwendung bei den Katalyseverfahren der chemischen Technik (14). Es wäre also durchaus möglich, daß sie auch Reaktionen in der lebendigen Substanz — wie die Gärung — katalysieren. Daß in den Bakterien tatsächlich neben Eisen z. B. große Mengen von Kupfer enthalten sind, die katalytisch wirken könnten, wurde mit der Cysteinemethode (15) in der Bakterienasche nachgewiesen: In 1 g Buttersäurebakterien (Trockengewicht) fanden sich im Durchschnitt $3 \cdot 10^{-1}$ mg Eisen und $3 \cdot 10^{-2}$ mg Kupfer.

V. Methodik und Protokolle.

Als Material dienten Kulturen eines Stammes von *Clostridium butyricum* des Berliner Instituts für Gärungsgewerbe. Die Kulturen wurden anaerob unter Paraffin in Zuckerbouillon gezüchtet, vor dem Versuch unter Paraffin zentrifugiert, zweimal mit Kochsalzlösung unter Paraffin gewaschen und anaerob unter N₂ oder H₂ in der jeweiligen Versuchsflüssigkeit suspendiert (bicarbonat- oder phosphatgepufferte Ringer-Lävuloselösung oder Zuckerbouillon).

¹ Die Messung der Beleuchtungsstärke wurde von Herrn Dipl.-Ing. Goldmann vom Optischen Laboratorium der Firma Oram mit Hilfe eines Bechsteinschen Beleuchtungsmessers ausgeführt, wofür wir ihm auch an dieser Stelle herzlichst danken.

Wirkung von Blausäure und Kohlenoxyd auf die Buttersäuregärung. 51

Die Bakteriensuspension wurde in einen Standzylinder gegeben, durch den ebenfalls H_2 oder N_2 hindurchströmte, und um eine vollkommen homogene Bakteriensuspension zu erhalten, wurde der Standzylinder geschlossen und kräftig geschüttelt.

Da die zur Verfügung stehende Bakterienmenge und die Größe des Stoffwechsels ungleichmäßig waren (verschieden starkes Wachstum, Abhängigkeit vom Alter, vom Medium), wurde vor Beginn des Versuchs stets ein sogenanntes „Probekästchen“ eingehängt; d. h. 1 ccm des Bakterien-gemisches wurde in ein mit H_2 oder N_2 gesättigtes Manometerkästchen pipettiert und die Gasbildung gemessen. Der in 5 Minuten abgelesene Druck diente zur Berechnung des zu erwartenden Gesamtdruckes im jeweiligen Versuch und gab die Möglichkeit, die Bakterienmenge der Suspension abzuschätzen und durch Verdünnung der Suspension die manometrischen Drucke zu dosieren.

Der Sauerstoffgehalt der zur Sättigung verwendeten Gase wurde manometrisch in Kegelvorlagen mit verschließbarer, Natriumhydrosulfit-Kalilauge enthaltender Anhangsbirne gemessen. Der in Bomben käufliche Stickstoff war mit Sauerstoff verunreinigt, Wasserstoff und Kohlensäure waren sauerstofffrei. Darum wurden Stickstoff und Stickstoff enthaltende Gemische stets über glühendes Kupfer geleitet oder die Sauerstoffverunreinigungen im Versuchsgefäß durch Phosphor absorbiert. Ob mit H_2 , N_2 oder CO_2 gesättigt wurde, war auf den Stoffwechsel der Bakterien ohne wesentlichen Einfluß.

Die Größe des Stoffwechsels wird bezeichnet durch den Quotienten Q_B : die von 1 mg Bakterien in 1 Stunde gebildete Menge Buttersäure in Kubikmillimeter. 1 cmm entspricht $3,9 \cdot 10^{-3}$ mg. Versteht man unter

α_{CO_2} den Absorptionskoeffizienten für Kohlensäure,

α_{H_2} den Absorptionskoeffizienten für Wasserstoff,

T die absolute Temperatur,

v_G den Gasraum des Versuchsgefäßes,

v_F die Flüssigkeitsmenge im Versuchsgefäß,

h_1 die abgelesene Druckänderung in Millimeter Brodie bei Messung in Phosphatmedium,

h_2 die abgelesene Druckänderung in Millimeter Brodie bei Messung in Bicarbonatmedium,

K_1 die Gefäßkonstante bei Messung in Phosphatmedium,

K_2 die Gefäßkonstante bei Messung in Bicarbonatmedium,

so ist bei Messung in Phosphatmedium

$$K_1 = \frac{v_G \cdot \frac{273}{T} + v_F \cdot \frac{2 \alpha_{CO_2} + 2 \alpha_{H_2}}{4}}{10\,000},$$

$$Q_B = \frac{h_1 \cdot K_1}{4},$$

bei Messung in Bicarbonatmedium

$$K_2 = \frac{v_G \cdot \frac{273}{T} + v_F \cdot \frac{3 \alpha_{CO_2} + 2 \alpha_{H_2}}{5}}{10\,000},$$

$$Q_B = \frac{h_2 \cdot K_2}{5}.$$

52

W. Kempner:

Protokoll 1.

Der Versuch zeigt, daß bei der Gasbildung durch Buttersäurebakterien im Phosphatmedium zur Hälfte Kohlensäure, zur Hälfte Wasserstoff entsteht. Im Bicarbonatmedium ist die Gesamtgasbildung um ein Fünftel größer als im Phosphatmedium, das Verhältnis Kohlensäure: Wasserstoff ist 3:2. 38° C. Sättigungsgas über Kupfer geglüht. Suspensionsflüssigkeit: Ringer, m/60 Lävulose, m/50 Phosphat bzw. Ringer, m/60 Lävulose, m/235 Bicarbonat. $p_H = 6,4$. Trockengewicht der in 1 cem suspendierten Bakterienmenge: 1,09 mg.

| | | | | | | | | | | |
|--------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|------|--------------|------|------|----|
| Volumina in cem | $v_F = 1$ $v_G = 15,85$ | $v_F = 1$ $v_G = 17,18$ | $v_F = 1,2$ $v_G = 16,90$ | $v_F = 1$ $v_G = 16,73$ | $v_F = 1$ $v_G = 14,98$ | | | | | |
| Gefäßkonstanten in qmm | 1,422 | 1,565 | 1,491 | 1,506 | 1,373 | | | | | |
| Anhangsbirne | — | 0,05 g Palladiumrohr | 0,2 cem 5 %ig. KOH | — | 0,05 g Palladiumrohr | | | | | |
| Hauptraum | 1 cem Suspension (Phosphat) | 1 cem Suspension (Phosphat) | 1 cem Suspension (Phosphat) | 1 cem Suspension (Bicarbonat) | 1 cem Suspension (Bicarbonat) | | | | | |
| Gasraum | 100 % N_2 | 100 % N_2 | 100 % N_2 | 10 % CO_2 /90 % N_2 | 10 % CO_2 /90 % N_2 | | | | | |
| Gasbildung: | mm Brodie | emm | mm Brodie | emm | mm Brodie | emm | mm Brodie | emm | | |
| Nach 30 Min. | + 27 | 38,5 | + 13 | 20,5 | + 13,5 | 20 | + 32 | 48 | + 22 | 30 |
| „ 60 „ | + 55 | 78,5 | + 25 | 39 | + 26,5 | 39,5 | + 65,5 | 98,5 | + 43 | 59 |

Wirkung von Blausäure und Kohlenoxyd auf die Buttersäuregärung. 53

Protokoll 2.

Der Versuch zeigt, daß die Buttersäuregärung durch $1 \cdot 10^{-3}$ mol. Blausäure gehemmt wird und daß diese Hemmung reversibel ist. Mit H_2 gesättigt. Suspensionsflüssigkeit: Ringer, m/60 Lävulose, m/50 Phosphat. $p_H = 6,2$. Temperatur vor der Verdünnung $30^\circ C$, nach der Verdünnung $37^\circ C$.

| $30^\circ C$ | Gefäß 1 | | Gefäß 2 | | Gefäß 3 | |
|--|--|------|---|-----|--|------|
| Volumina in ccm | $v_F = 5$ | | $v_F = 5$ | | $v_F = 5,05$ | |
| | $v_G = 7,61$ | | $v_G = 8,56$ | | $v_G = 7,83$ | |
| Gefäßkonstanten in qmm | 0,860 | | 0,946 | | 0,883 | |
| Blausäuregehalt | — | | — | | m/1000 | |
| Trockengewicht der in 5 ccm suspendierten Bakterienmenge | 2,30 mg | | 2,30 mg | | 2,30 mg | |
| Gasbildung: | mm Brodie | emm | mm Brodie | emm | mm Brodie | emm |
| Nach 10 Min. | + 22,5 | 19,5 | + 19 | 18 | + 7,5 | 6,5 |
| " 20 " | + 46 | 39,5 | + 40 | 38 | + 14 | 12,5 |
| | ↓ | | ↓ | | ↓ | |
| | 4 ccm abpipettiert 4 ccm Ringer- Lävulose-Phosphat zupipettiert | | 4 ccm abpipettiert 4 ccm Ringer- Lävulose-Phosphat zupipettiert m/5000 HCN zugesetzt | | 4,04 ccm abpipettiert 4,04 ccm Ringer- Lävulose-Phosphat zupipettiert | |
| $37^\circ C$ | Gefäß 1 | | Gefäß 2 | | Gefäß 3 | |
| Volumina in ccm | $v_F = 5$ | | $v_F = 5,05$ | | $v_F = 5,05$ | |
| | $v_G = 7,61$ | | $v_G = 8,51$ | | $v_G = 7,83$ | |
| Gefäßkonstanten in qmm | 0,809 | | 0,890 | | 0,880 | |
| Blausäuregehalt | — | | m/5000 | | m/5000 | |
| Trockengewicht der in 5 ccm suspendierten Bakterienmenge | 0,46 mg | | 0,46 mg | | 0,46 mg | |
| Gasbildung: | mm Brodie | emm | mm Brodie | emm | mm Brodie | emm |
| Nach 30 Min. | + 24 | 19,5 | + 17 | 15 | + 17,5 | 14,5 |
| " 60 " | + 50 | 40,5 | + 34 | 30 | + 35 | 29 |

Daraus folgt: Hemmung der Buttersäuregärung durch $1 \cdot 10^{-3}$ mol. HCN:

$$\frac{39 - 12,5}{39} = 68 \%$$

Nach Verdünnung (Gefäß 3) bzw. Neuzusetzen von Blausäure (Gefäß 2) Hemmung durch $2 \cdot 10^{-4}$ mol. HCN:

$$\frac{40,5 - 29}{40,5} = 28 \%, \quad \text{bzw.} \quad \frac{40,5 - 30}{40,5} = 26 \%$$

Die Hemmung durch m/1000 HCN ist also reversibel. Die nach der Verdünnung bleibende Hemmung von 28 % ist durch die bleibende Blausäurekonzentration von m/5000 bedingt, wie der Vergleich von Gefäß 2 und 3 zeigt.

54

Protokoll 3.

Der Versuch zeigt, daß die Buttersäuregärung durch Kohlenoxyd gehemmt wird und daß die Hemmung reversibel ist.
37° C. Suspensionsflüssigkeit: Ringer, m/60 Lävulose, m/50 Phosphat. $p_H = 6,2$. Trockengewicht der in 1 cm
suspendierten Bakterienmenge: 0,87 mg.

| | | | | |
|----------------------------------|----------------------|---------------|----------------------|---------------|
| Volumina in cm | $v_F = 1$ | $v_G = 11,29$ | $v_F = 1$ | $v_G = 11,72$ |
| Gefäßkonstanten in qmm | 1,023 | | 1,059 | |
| Gasraum | 100 % H ₂ | | 100 % CO | |
| Gasbildung: | mm | cm | mm | cm |
| Nach 30 Min. | + 36 | 37 | + 6,5 | 7 |
| " 60 " | + 76,5 | 78 | + 12,5 | 13,5 |
| | ↓ | | ↓ | |
| Gasraum | 100 % H ₂ | | 100 % H ₂ | |
| Gasbildung: | mm | cm | mm | cm |
| Nach 30 Min. | + 36,5 | 37,5 | + 36 | 38 |
| " 60 " | + 74,5 | 76 | + 73,5 | 78 |

Daraus folgt: Hemmung der Buttersäuregärung durch 100 % CO:

$$\frac{78 - 13,5}{78} = 83 \%$$

Durch Entfernung des CO war die Hemmung der Buttersäuregärung reversibel, wie die letzte Horizontalspalte zeigt.

W. Kemper:

Wirkung von Blausäure und Kohlenoxyd auf die Buttersäuregärung. 55

Protokoll 4.

Der Versuch zeigt, daß der chemisch bestimmte Zuckerverbrauch der manometrisch gemessenen Gasbildung — sowohl in H_2 wie in CO — entspricht. $37^\circ C$. Suspensionsflüssigkeit: Ringer, m/65 Lävulose, m/50 Phosphat. $p_H = 6,2$. Trockengewicht der in 1 ccm suspendierten Bakterienmenge: 1,22 mg.

| | | | |
|---|--|----------------------------|---------------------|
| Volumina in ccm | $v_F = 1$ $v_G = 10,90$ | $v_F = 1$ $v_G = 12,40$ | |
| Gefäßkonstanten in qmm | 0,987 | 1,119 | |
| Gasraum | 100 % H_2 | 100 % CO | |
| Gasbildung: | mm Brodie cmm | mm Brodie cmm | |
| Nach 60 Min. | + 123,5 122 | + 16 18 | |
| " 120 " | + 238 235 | + 32 36 | |
| " 180 " | + 345 340 | + 45,5 51 | |
| " 240 " | + 463 457 | + 58 65 | |
| Daraus errechneter Zuckerverbrauch in mg | $92 \cdot 10^{-2}$ | $13 \cdot 10^{-2}$ | |
| Zuckergehalt der Versuchs- flüssigkeit (mg in 1 ccm) { | Bei Beginn der mano- metrischen Messung . . | $277 \cdot 10^{-2}$ | $277 \cdot 10^{-2}$ |
| | Nach Beendigung d. mano- metrischen Messung . . | $183 \cdot 10^{-2}$ | $263 \cdot 10^{-2}$ |
| Chemisch bestimmter Zuckerverbrauch in mg | $94 \cdot 10^{-2}$ | $14 \cdot 10^{-2}$ | |

Protokoll 5.

Der Versuch zeigt, daß die Kohlenoxydhemmung der Buttersäuregärung bei Belichtung mit 1 Million Hefner-Lux nicht reversibel ist. $37^\circ C$. Suspensionsflüssigkeit: Ringer, m/60 Lävulose, m/50 Phosphat. $p_H = 6,2$. Trockengewicht der in 1 ccm suspendierten Bakterienmenge: 0,62 mg.

| | | | |
|----------------------------------|----------------------------|--------------------------|----------------------------|
| Volumina in ccm | $v_F = 1$ $v_G = 10,90$ | $F = 1$ $v_G = 11,29$ | $v_F = 1$ $v_G = 12,40$ |
| Gefäßkonstanten in qmm | 0,987 | 1,022 | 1,119 |
| Gasraum | 100 $\frac{0}{10} H_2$ | 100 $\frac{0}{10} CO$ | 100 $\frac{0}{10} CO$ |
| Druckänderung in mm { | 20' d + 19 | 20' d + 3,5 | 20' d + 3 |
| Brodie (h bedeutet hell: | 20' h + 20 | 20' h + 3 | 20' d + 2,5 |
| Belichtung mit 1 Million | 20' d + 20 | 20' d + 3,5 | 20' d + 3,5 |
| Hefner-Lux, d bedeutet | 20' h + 17,5 | 20' h + 3,5 | 20' d + 3 |
| dunkel) | 20' d + 18 | 20' d + 3 | 20' d + 3,5 |

56 W. Kempner: Wirkung von Blausäure und Kohlenoxyd usw.

Literatur.

- 1) Warburg, diese Zeitschr. 177, 471, 1926. — 2) Derselbe, ebenda 189, 354, 1927. — 3) Derselbe, ebenda 165, 196, 1925. — 4) Peschel, Klin. Wochenschrift 1930, 23, 1061. — 5) Warburg u. Uyesugi, diese Zeitschr. 146, 486, 1924. — 6) Warburg, ebenda 119, 134, 1921. — 7) Negelein, ebenda 165, 203, 1925. — 8) Warburg, Zeitschr. f. Elektrochem. 35, Nr. 12, 1929. — 9) Mond u. Langer, Chem. News 64, 294, 1891. — 10) Dewar u. Jones, Proc. Roy. Soc. (A) 76, 558, 1905; 79, 66, 1907. — 11) Haldane u. Smith, J. of Physiol. 20, 497, 1896. — 12) Krebs, diese Zeitschr. 204, 322, 1929. — 13) Cremer, ebenda 194, 231, 1928. — 14) Sabatier, Die Katalyse in der organischen Chemie. Leipzig 1914; Mittasch, Ber. d. Deutsch. chem. Ges. 59, 13, 1926. — 15) Warburg, diese Zeitschr. 187, 255, 1927.

Biochemische Zeitschrift. 257. Bd. 1.—3. Heft.

| <i>Fortsetzung des Inhaltsverzeichnisses.</i> | Seite |
|--|-------|
| Bungenberg de Jong, H. G. und F. A. Menalda. Zur Kenntnis der Komplexkoazervation. XIV. Mitteilung: Autokomplexflockung von Natrium-Hefenucleinsäuren | 62 |
| Keller, Rudolf. Zur Elektrochemie der Leber und Galle | 78 |
| — Biochemie der Spermatozoon und Eizellen | 86 |
| Kisch, Bruno und Karl Schuwirth. Chinone als Fermentmodell. VIII. Mitteilung: Der CO_2/NH_3 -Quotient der oxydativen Aminosäure-desaminierung | 89 |
| Kisch, Bruno. Die Beeinflussung der Gewebsatmung durch Phosphate | 95 |
| Verzár, F., A. von Árvay, J. Peter, H. Scholderer. Serum-Bilirubin und Erythropoese im Hochgebirge | 113 |
| Ludány, G. v. und F. Verzár. Der Einfluß der Milz auf den Bilirubin-gehalt des Blutserums. Versuche über die Wirkung von Milz-exstirpation, Milzkontraktion, Anämie- und Asphyxie | 130 |
| Scholderer, H. Das Verschwinden von in die Blutbahn injiziertem Bilirubin aus dieser und der Einfluß der Milz hierauf | 137 |
| — Untersuchungen über die Resorption von Bilirubin aus dem Darm | 145 |
| Fürth, Otto und Rudolf Scholl. Über die Beeinflussung der Löslichkeit von Fettsäuren in gallensauren Salzen durch Lecithin und Natrium-chlorid | 151 |
| Minibek, Harald. Über die Gallensäuren in den Fäzes und deren Beziehung zur Fettresorption bei Kindern | 160 |
| Bloch, Alfred. Das Cholesterin bei der Liebermann-Burchardschen Farbreaktion | 171 |
| Blix, Gunnar. Elastizitätserscheinungen an Blutplasma und Blutserum im Kapillarviskosimeter | 180 |
| Schmalzfuß, Hans, Alfred Heider und Kurt Winkelmann. 3,4-Dioxy-phenyllessigsäure, Farbvorstufe der Flügeldecken des Mehlkäfers, <i>Tenebrio molitor</i> L. | 188 |
| Ehrenberg, Paul und Herbert Briese. Der Ersatz des Kraftfutter-eiweißes bei der Fütterung von Milchkühen durch Ammonium-bicarbonat | 194 |
| Asher, Doris. Weitere Isolierung des wachstumsfördernden Thymo-crescins | 209 |
| Abelin, I. Über den Einfluß des höher jodierten bzw. bromierten Schilddrüsen-eiweißes auf den Stoffwechsel | 213 |
| Jacobsen, Erik. Untersuchungen über den Umsatz des Adenylpyro-phosphats in vitro | 221 |
| Redenz, E. Über den Spaltungsstoffwechsel der Säugetierspermatozoen im Zusammenhang mit der Beweglichkeit | 234 |
| Okuneff, N. Über einige physiko-chemische Erscheinungen während der Regeneration. V. Mitteilung: Über den Milchsäuregehalt regene-rierender Axolotl Extremitäten | 242 |
| Berichtigung | 244 |

*Wirkung des Lichtes auf die
Kohlenoxydhemmung der Buttersäuregärung
[Effect of Light on the Inhibition of
Butyric Acid Fermentation by Carbon Monoxide]*

**Effect of Light on the Inhibition
of Butyric Acid Fermentation by Carbon Monoxide
by Walter Kempner and Fritz Kubowitz**

According to tests reported previously, the fermentation of butyric acid (cleavage of sugar into butyric acid, carbonic acid, and hydrogen) is reversibly inhibited by carbon monoxide. The fermentation of butyric acid—an anaerobic metabolic process—thus behaves with regard to carbon monoxide (CO) like the oxygen respiration of aerobic cells.

Like the CO inhibition of oxygen respiration, the inhibition of anaerobic butyric acid fermentation by CO is entirely and reversibly terminated by light. However, the CO inhibition of butyric acid fermentation is far less light-sensitive than the CO inhibition of the respiration of aerobic cells.

The effect of light on the inhibition of butyric acid fermentation by CO makes it possible, by exposure to different color light, to determine the "color" of the enzyme, whose bonding to CO inhibits the fermentation.

Biochemische Zeitschrift

Unter Mitwirkung von

E. Abderhalden-Halle a. S., M. Ascoli-Palermo, L. Asher-Bern, A. Bach-Moskau, G. Barger-Edinburgh, M. Bergmann-Dresden, G. Bertrand-Paris, A. Bickel-Berlin, F. Blumenthal-Belgrad, Fr. Bous-München, J. Bodnár-Debreczen, A. Bonanni-Rom, F. Bottazzi-Neapel, G. Bredig-Karlsruhe i. B., W. L. Butkewitsch-Moskau, M. Cremer-Berlin, R. Doerr-Basel, A. Durig-Wien, R. Ege-Kopenhagen, F. Ehrlich-Breslau, H. v. Euler-Stockholm, M. Ferreira de Mira-Lisabon, S. Flexner-New York, A. Fodor-Jerusalem, J. Forsman-Lund, S. Fränkel-Wien, E. Freund-Wien, H. Freundlich-Berlin, E. Friedmann-Moskau, O. Fürth-Wien, F. Haber-Berlin, M. Hahn-Berlin, E. Hammarsten-Stockholm, F. Hayduck-Berlin, E. Hägglund-Stockholm, V. Henri-Zürich, V. Henriques-Kopenhagen, R. O. Herzog-Berlin, K. Hess-Berlin, W. Heubner-Berlin, R. Höber-Kiel, M. Jacoby-Berlin, P. Karrer-Zürich, E. Kisch-Köln, G. Klein-Heidelberg, W. Klein-Bonn, A. J. Kluyver-Delft, M. Kochmann-Halle a. S., R. Krimberg-Riga, F. Landolf-Buenos Aires, E. Laqueur-Amsterdam, O. Lemmermann-Berlin, P. A. Levene-New York, S. Loewe-Mannheim, A. Loewy-Davos, H. Lüers-München, Th. Madsen-Kopenhagen, A. Magnus-Levy-Berlin, E. Mangold-Berlin, L. Marchlewski-Krakau, P. Mayer-Karlsbad, A. McKenzie-Dundee, J. Melsenheimer-Tübingen, Kurt H. Meyer-Genf, O. Meyerhof-Heidelberg, L. Michaelis-New York, H. Molisch-Wien, W. Nernst-Berlin, K. Noack-Berlin, C. v. Noorden-Wien, Orla-Jensen-Kopenhagen, W. Ostwald-Leipzig, A. Palladin-Charkow, J. K. Parnas-Lemberg, W. Pauli-Wien, W. H. Peterson-Madison, R. Pfeiffer-Breslau, E. P. Pick-Wien, L. Pincussen-Berlin, J. Pohl-Hamburg, Ch. Porcher-Paris, D. N. Priginskij-Moskau, H. Pringsheim-Berlin, A. Rippel-Göttingen, P. Rona-Berlin, H. Sachs-Heidelberg, T. Sasaki-Tokio, B. Sbarsky-Moskau, A. Scheunert-Leipzig, E. Schmitz-Breslau, J. Snapper-Amsterdam, S. P. L. Sörensen-Kopenhagen, J. Stoklasa-Frag, W. Straub-München, H. Steenbock-Madison, K. Suto-Kanazawa, U. Suzuki-Tokio, K. Thomas-Leipzig, F. Verzar-Basel, A. I. Virtanen-Helsingfors, O. Warburg-Berlin, H. J. Waterman-Delft, G. v. Wendt-Helsingfors, E. Widmark-Lund, A. Wohl-Danzig, J. Wohlgemuth-Berlin, N. Zelinsky-Moskau

herausgegeben von

C. Neuberg und W. Grassmann

Berlin-Dahlem

München

Sonderabdruck aus 265. Band, 4.—6. Heft

Walter Kempner und Fritz Kubowitz:

**Wirkung des Lichtes auf die Kohlenoxydhemmung
der Buttersäuregärung**



Berlin

Verlag von Julius Springer

1933

Wirkung des Lichtes auf die Kohlenoxydhemmung der Buttersäuregärung.

Von

Walter Kempner und Fritz Kubowitz.

(Aus dem Kaiser Wilhelm-Institut für Zellphysiologie, Berlin-Dahlem.)

(Eingegangen am 7. August 1933.)

Mit 2 Abbildungen im Text.

Nach früher mitgeteilten Versuchen¹ wird die Buttersäuregärung (Spaltung von Zucker zu Buttersäure, Kohlensäure und Wasserstoff) durch Kohlenoxyd reversibel gehemmt. Die Buttersäuregärung — ein *anaerober* Stoffwechselvorgang — verhält sich also gegen Kohlenoxyd wie die Sauerstoffatmung aerober Zellen².

Wir haben untersucht, ob die Kohlenoxydhemmung der Buttersäuregärung, ebenso wie die Kohlenoxydhemmung der Atmung, verschwindet, wenn man belichtet. Bei den anfangs zur Verfügung stehenden Lichtintensitäten¹, die bereits wesentlich größer waren als die zur Aufhebung der Kohlenoxydhemmung der Atmung erforderlichen, ließ sich eine Wirkung des Lichtes auf die Kohlenoxydhemmung der Buttersäuregärung nicht feststellen. Erst als die Möglichkeit gegeben war, erheblich größere Lichtintensitäten anzuwenden, und die Lichtempfindlichkeit dadurch gesteigert wurde, daß man bei möglichst tiefer Temperatur³ belichtete, trat der gesuchte Lichteffect auf: die Hemmung der Buttersäuregärung verschwand bei Belichtung und stieg bei Verdunkelung wieder auf den Anfangswert.

Ebenso wie die Kohlenoxydhemmung der Sauerstoffatmung kann also die Kohlenoxydhemmung der anaeroben Buttersäuregärung durch Belichtung vollständig und reversibel aufgehoben werden. Doch ist die Kohlenoxydhemmung der Buttersäuregärung viel weniger lichtempfindlich als die Kohlenoxydhemmung der Atmung aerober Zellen. (Bei + 10°C wirkt die Hg-Linie 436 m μ auf die Kohlenoxydhemmung

¹ Diese Zeitschr. 257, 41, 1933.

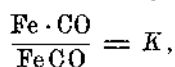
² Die Sauerstoffatmung der Buttersäurebakterien ist ebenso wie die Sauerstoffatmung anderer anaerober Bakterien durch Kohlenoxyd nicht hemmbar. Von der Sauerstoffatmung der Buttersäurebakterien ist jedoch in dieser Arbeit nicht die Rede: alle Versuche wurden bei vollständigem Sauerstoffabschluß ausgeführt.

³ Diese Zeitschr. 255, 251, 1932.

der Torulaatmung etwa 300mal stärker als auf die Kohlenoxydhemmung der Buttersäuregärung.)

Die Wirkung des Lichtes auf die Kohlenoxydhemmung der Buttersäuregärung macht es möglich, ebenso wie bei der Sauerstoffatmung aerober Zellen, durch Belichtung mit verschiedenfarbigem Licht die „Farbe“ des Ferments zu bestimmen, durch dessen Bindung an Kohlenoxyd die Gärung gehemmt wird.

Bezeichnen wir dieses Ferment mit Fe, so haben wir in Buttersäurebakterien bei Gegenwart von Kohlenoxyd das Gleichgewicht:



wo K die Dissoziationskonstante der Kohlenoxydverbindung des Ferments ist. Bei Belichtung wird K größer. Nennt man K_{hell} die Dissoziationskonstante bei Belichtung und K_{dunkel} die Dissoziationskonstante im Dunkeln, so ist

$$\Delta K = K_{\text{hell}} - K_{\text{dunkel}},$$

wo K_{hell} von der Intensität und der Wellenlänge des Lichtes abhängt. ΔK ist die Größe, die wie bei der Kohlenoxydhemmung der Atmung aerober Zellen, der wirkenden Lichtintensität proportional ist (Tabelle I, Abb. 1, Protokoll 1).

Tabelle I.

| Lichtintensität calorien Min. · qcm | Dissoziationskonstante der Kohlenoxydverbindung des Ferments K [Atm.] | Lichtwirkung $\Delta K = K_{\text{hell}} - K_{\text{dunkel}}$ [Atm.] | Lichtwirkung Lichtintensität |
|---|---|--|---------------------------------|
| 0 | $K_d = 1,545 \cdot 10^{-2}$ | — | |
| $2,79 \cdot 10^{-2}$ | $K_h = 2,370 \cdot 10^{-2}$ | $0,825 \cdot 10^{-2}$ | 0,296 |
| $6,73 \cdot 10^{-2}$ | $K_h = 3,600 \cdot 10^{-2}$ | $2,055 \cdot 10^{-2}$ | 0,305 |
| $17,15 \cdot 10^{-2}$ | $K_h = 7,180 \cdot 10^{-2}$ | $5,635 \cdot 10^{-2}$ | 0,328 |

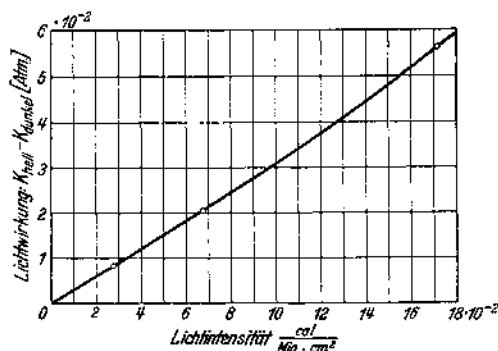


Abb. 1. Abhängigkeit der Lichtwirkung von der Lichtintensität.

Wirkung d. Lichtes a. d. Kohlenoxydhemmung d. Buttersäuregärung. 247

Wir haben durch Kohlenoxyd gehemmte Buttersäurebakterien mit verschiedenfarbigem Licht gemessener Flächenintensität J_λ bestrahlt und die ΔK -Werte bestimmt. Aus ΔK und J_λ wurde der auf $\lambda_{436\text{ m}\mu}$ bezogene Absorptionskoeffizient β in bekannter Weise berechnet¹.

Tabelle II.

| Wellenlänge (oder Wellenlänge des Schwerpunktes des betreffenden Spektralbezirkes) (m μ) | Lichtquelle | Breite des Spektralbezirkes | Intensität* des Lichtes in cal Min. | $\frac{\beta_\lambda}{\beta_{436}}$ |
|---|--------------------|-----------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|
| λ 366 | Hg-Lampe | Hg-Linie | $1,60 \cdot 10^{-1}$ | 2,10 |
| λ 385 | Weißer Effektkohle | 30 m μ | $1,50 \cdot 10^{-1}$ | 1,95 |
| λ 435 | " " | 60 m μ | $2,85 \cdot 10^{-1}$ | 1,00 |
| λ 436 | Hg-Lampe | Hg-Linie | $1,30 \cdot 10^{-1}$ | 1,00 |
| λ 450 | Weißer Effektkohle | 60 m μ | $3,50 \cdot 10^{-1}$ | 0,58 |
| λ 535 | " " | 60 m μ | $8,70 \cdot 10^{-1}$ | 0,30 |
| λ 546 | Hg-Lampe | Hg-Linie | $3,15 \cdot 10^{-1}$ | 0,84 |
| λ 587 | Weißer Effektkohle | 55 m μ | $3,90 \cdot 10^{-1}$ | 0,16 |
| λ 650 | " " | 65 m μ | $15,35 \cdot 10^{-1}$ | 0,04 |

* Gesamtintensität des durch Linsen und Blenden geordneten Strahlenkegels, der für die Versuche zur Verfügung stand. Um daraus die Flächenintensität J zu erhalten, hat man durch die „Lichtflächen“ an der Bestrahlungsstelle (etwa 12,5 qcm) zu dividieren (vgl. diese Zeitschr. 255, 1932, insbesondere S. 268).

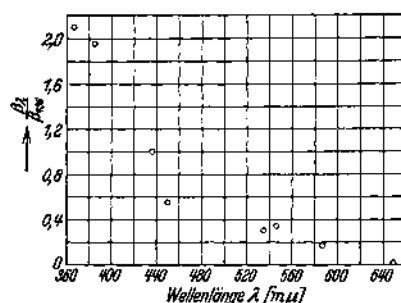


Abb. 2. Auf die blaue Hg-Linie 436 m μ bezogene Absorptionskoeffizienten der Kohlenoxydverbindung des Ferments.

In Abb. 2 sind die bisher gemessenen β -Werte als Funktion der Wellenlänge eingetragen. Wie man sieht, ist die Kohlenoxydverbindung des Ferments eine Substanz, die in dem untersuchten Spektralgebiet — rot (650 m μ) bis ultraviolett (366 m μ) — absorbiert.

Experimentelles.

Als Versuchsmaterial dienten Buttersäurebakterien: *Clostridium butyricum* (aus dem Institut für Gärungsgewerbe, Berlin). Sie wurden gezüchtet in Maische + Calciumcarbonatzusatz bei + 36° C; das Kulturalter war 22 Stunden. Die Züchtung erfolgte in Kulturkolben: Flüssig-

¹ Diese Zeitschr. 202, 202, 1928; 214, 77, 1929; 255, 257, 1932.

keits- und Gasraum wurden nach Verimpfung der Bakterien etwa 10 Minuten lang mit Argon durchströmt; dann wurde durch Wasserverschluß gegen Luftzutritt abgeschlossen (anaerobe Züchtung). Verimpft wurde eine Platinöse Bakteriensuspension auf ungefähr 300 bis 400 ccm Maische. Ausbeute nach 22 Stunden etwa 600 cmm Zellen. Durch kurzes Zentrifugieren wurde die Bakteriensuspension von Kreide und festen Maischebestandteilen befreit; durch weiteres Zentrifugieren wurden die Zellen von der Maische getrennt. Nach einmaligem Waschen mit 0,9 %iger NaCl-Lösung oder Ringerlösung (ohne Bicarbonat) wurden die Bakterien in die Versuchslösung gebracht, die im Liter enthielt:

| | |
|---|--|
| 60 ccm m/2 Na_2HPO_4 -Lösung | 10 ccm 1,15 %ige KCl-Lösung |
| 40 „ m/2 KH_2PO_4 -Lösung | 10 „ 0,11 mol. CaCl_2 -Lösung |
| 780 „ 0,9 %ige NaCl-Lösung | 100 „ 10 %ige Lävuloselösung |
| p_{H} der Versuchslösung war etwa 6,6. | |

Die Zellmengenbestimmung erfolgte im Hämatokriten. Zu den Versuchen wurden täglich frische Kulturen verwendet.

Die Messung der Gärung, der Gärungshemmung und der Lichtwirkung erfolgte im Differentialmanometer bei $+ 8^\circ \text{C}$. Die Gefäße waren Quarztröge¹ mit Ventilstopfen. Um zeitlich möglichst konstante Ablesungen zu erhalten, wurde die Buttersäurebakteriensuspension im Manometergefäß vor Beginn der Messung 1 bis 2 Stunden in Argonatmosphäre geschüttelt. Die Ablesung der Druckänderungen erfolgte während des Schüttelns mit Hilfe eines Ablesekathetometers. Als Lichtquelle zur Bestrahlung diente eine Hochleistungsbogenlampe² oder eine Hg-Lampe mit einem sehr lichtstarken Kondensor. Die Filterung der Spektralbezirke geschah mittels Lichtfilter³. Die Bestrahlung des Versuchsgefäßes erfolgte mittels totalreflektierendem Quarzprisma von unten her*. Das Manometer wurde bei einer Tourenzahl von etwa 250 Umdrehungen pro Minute rotierend geschüttelt. Das Versuchsgefäß war beim Belichten dauernd im Lichtkegel.

Die Lichtintensität wurde wie bei ähnlichen, früher beschriebenen, Versuchen bestimmt⁴. Die Lichtintensitäten müssen wegen der kleinen Lichtempfindlichkeit relativ hoch sein, deshalb sind die Spektralbezirke des aus der „weißen Effektkohle“ isolierten Lichtes relativ breit (siehe Tabelle II).

Die Anordnung und Auswertung einer Messung zeigt Protokoll 2.

¹ Diese Zeitschr. 200, 455, 1928, Abb. 8.

² Ebenda 255, 248, 1932.

³ Siehe ebenda 255, 252, 1932.

* Nach Art der Abb. 4, diese Zeitschr. 193, 344, 1928.

⁴ Ebenda 255, 249, 268, 1932.

Wirkung d. Lichtes a. d. Kohlenoxydhemmung d. Buttersäuregärung. 249

Protokolle.

Protokoll 1.

Einfluß der Lichtintensität auf die Verteilung des Ferments bei „Clostridium butyricum“.

Versuchstemperatur: + 8° C.

Versuchsgefäß: V_p : 1,5 ccm Bakteriensuspension + Lävulose (40 cmm Zellen in Phosphatlösung, V_g : Argon oder Kohlenoxyd-Argongemisch.Kompensationsgefäß: V_p : 1,5 ccm Phosphatlösung, V_g : Luft.

Die Bestrahlung erfolgte mit „weißem Licht“ aus der Bogenlampe.

Mittels Filter wurden entfernt: Wärmestrahlung, ultraviolettes Licht und kurzwelliges Blau.

Die Intensitätsabstufung erfolgte mittels eines in den Strahlengang geschalteten schnellaufenden Sektors.

| Gasraum des Versuchsgefäßes | Messung im Dunkeln oder während der Belichtung | Meßperiode Min. | Druckänderung während der Meßperiode mm Brodie | Mittelwert der Druckänderungen (in 3 Min.) mm Brodie | Lichtintensität cal Min. . qcm | Gärungswert n: $\frac{\text{Gärung}}{\text{Gärung in Argon (Mittelwerte)}}^*$ |
|-----------------------------|--|-----------------|--|--|--------------------------------|---|
| Argon | | 6 | + 7,06 | + 3,53 | — | $n = 1$ |
| " | | 3 | + 3,55 | | | |
| " | | 3 | + 3,53 | | | |
| " | | 3 | + 3,53 | | | |
| 3 % CO in Argon | dunkel | 3 | + 1,23 | + 1,16 | — | $n_d = 0,34$ |
| | " | 3 | + 1,13 | | | |
| | " | 3 | + 1,07 | | | |
| | " | 3 | + 1,22 | | | |
| | " | 3 | + 1,17 | | | |
| | belichtet | 3 | + 1,53 | + 1,52 | $2,79 \cdot 10^{-2}$ | $n_h = 0,44$ |
| | " | 3 | + 1,51 | | | |
| | " | 3 | + 1,93 | + 1,92 | $6,73 \cdot 10^{-2}$ | $n_h = 0,545$ |
| | " | 3 | + 1,86 | | | |
| | " | 3 | + 1,96 | | | |
| | " | 3 | + 2,48 | + 2,51 | $17,15 \cdot 10^{-2}$ | $n_h = 0,705$ |
| | " | 3 | + 2,57 | | | |
| | " | 3 | + 2,47 | | | |
| | " | 3 | + 1,96 | + 1,96 | $6,73 \cdot 10^{-2}$ | $n_h = 0,545$ |
| | " | 3 | + 1,96 | | | |
| | " | 3 | + 1,59 | + 1,61 | $2,79 \cdot 10^{-2}$ | $n_h = 0,44$ |
| | " | 3 | + 1,62 | | | |
| | dunkel | 3 | + 1,26 | + 1,26 | — | $n_d = 0,34$ |
| | " | 3 | + 1,26 | | | |
| | " | 3 | + 1,27 | | | |
| Argon | | 3 | + 3,65 | + 3,59 | — | $n = 1$ |
| " | | 3 | + 3,55 | | | |
| " | | 3 | + 3,57 | | | |
| " | | 3 | + 3,61 | | | |
| " | | 3 | + 3,56 | | | |

* Siehe auch Protokoll 2.

250

W. Kempner u. F. Kubowitz:

Berechnung.

Der Verteilungszustand¹ im Dunkeln ist:

$$V_d = \frac{n_d}{1 - n_d} = \frac{0,34}{1 - 0,34} = 0,515; K_d = \frac{n_d}{1 - n_d} \cdot p_{CO}^* = 1,545 \cdot 10^{-2} [\text{Atm.}].$$

Der Verteilungszustand beim Belichten mit der Lichtintensität $J_1 = 2,79 \cdot 10^{-2} \frac{\text{cal}}{\text{Min.} \cdot \text{qcm}}$ ist:

$$V_{h_1} = \frac{n_{h_1}}{1 - n_{h_1}} = \frac{0,44}{1 - 0,44} = 0,790; K_{h_1} = \frac{n_{h_1}}{1 - n_{h_1}} \cdot p_{CO} = 2,370 \cdot 10^{-2} [\text{Atm.}],$$

die im Licht erfolgte Verschiebung des Verteilungszustandes ist:

$$V_{h_1} - V_d = \frac{n_{h_1}}{1 - n_{h_1}} - \frac{n_d}{1 - n_d} = 0,790 - 0,515 = 0,275$$

$$K_{h_1} - K_d = \Delta K_1 = 0,825 \cdot 10^{-2} [\text{Atm.}].$$

$$\frac{\text{Lichtwirkung}}{\text{Lichtintensität}} = \frac{V_{h_1} - V_d}{J_1} = \frac{\Delta V_1}{J_1} = \frac{0,275}{2,79 \cdot 10^{-2}} = 9,85 \left[\frac{\text{qcm} \cdot \text{Min.}}{\text{cal}} \right],$$

oder

$$\frac{\text{Lichtwirkung}}{\text{Lichtintensität}} = \frac{K_{h_1} - K_d}{J_1} = \frac{\Delta K_1}{J_1} = 0,296 \left[\frac{\text{Atm.} \cdot \text{qcm} \cdot \text{Min.}}{\text{cal}} \right].$$

Der Verteilungszustand beim Belichten mit der Lichtintensität $J_2 = 6,73 \cdot 10^{-2} \frac{\text{cal}}{\text{Min.} \cdot \text{qcm}}$ ist:

$$V_{h_2} = \frac{0,545}{1 - 0,545} = 1,20; K_{h_2} = 3,60 \cdot 10^{-2} [\text{Atm.}],$$

die im Licht erfolgte Verschiebung des Verteilungszustandes ist:

$$V_{h_2} - V_d = 1,200 - 0,515 = 0,685; K_{h_2} - K_d = \Delta K_2 = 2,055 \cdot 10^{-2} [\text{Atm.}].$$

$$\frac{\text{Lichtwirkung}}{\text{Lichtintensität}} = \frac{V_{h_2} - V_d}{J_2} = \frac{\Delta V_2}{J_2} = \frac{0,685}{6,73 \cdot 10^{-2}} = 10,15 \left[\frac{\text{qcm} \cdot \text{Min.}}{\text{cal}} \right],$$

oder

$$\frac{\text{Lichtwirkung}}{\text{Lichtintensität}} = \frac{K_{h_2} - K_d}{J_2} = \frac{\Delta K_2}{J_2} = 0,305 \left[\frac{\text{Atm.} \cdot \text{qcm} \cdot \text{Min.}}{\text{cal}} \right]$$

¹ Siehe auch Protokoll 2.* p_{CO} = Kohlenoxyddruck (in Atm.).

Wirkung d. Lichtes a. d. Kohlenoxydhemmung d. Buttersäuregärung. 251

Der Verteilungszustand beim Belichten mit der Lichtintensität $J_3 = 17,15 \cdot 10^{-2} \frac{\text{cal}}{\text{Min.} \cdot \text{qcm}}$ ist:

$$V_{h_3} = \frac{0,705}{1 - 0,705} = 2,39; \quad K_{h_3} = 7,18 \cdot 10^{-2} [\text{Atm.}],$$

die im Licht erfolgte Verschiebung des Verteilungszustandes ist:

$$V_{h_3} - V_d = 2,390 - 0,515 = 1,875; \quad K_{h_3} - K_d = \Delta K_3 = 5,635 \cdot 10^{-2} [\text{Atm.}].$$

$$\frac{\text{Lichtwirkung}}{\text{Lichtintensität}} = \frac{V_{h_3} - V_d}{J_3} = \frac{\Delta V_3}{J_3} = \frac{1,875}{17,15 \cdot 10^{-2}} = 10,95 \left[\frac{\text{qcm} \cdot \text{Min.}}{\text{cal}} \right].$$

oder

$$\frac{\text{Lichtwirkung}}{\text{Lichtintensität}} = \frac{K_{h_3} - K_d}{J_3} = \frac{\Delta K_3}{J_3} = 0,328 \left[\frac{\text{Atm.} \cdot \text{qcm} \cdot \text{Min.}}{\text{cal}} \right].$$

Protokoll 2.

Bestimmung von $\frac{\beta_{546}}{\beta_{436}}$ der Kohlenoxydverbindung des Ferments bei „*clostridium butyricum*“.

Versuchstemperatur: + 8° C. Zellmenge: 90 cmm Zellen in 1,5 ccm Suspension.

Versuchsgefäß: V_F : 1,5 ccm Bakteriensuspension (Phosphatlösung + Lävulose), V_G : Argon oder Kohlenoxyd-Argongemisch.

Kompensationsgefäß: V_F : 1,5 ccm Phosphatlösung, V_G : Luft.

Gärungswert $n = \frac{\text{Gärung (im Dunkeln oder Licht im Kohlenoxyd-Argongemisch)}}{\text{Gärung in Argonatmosphäre}}$

V = Verteilungszustand des Ferments. V_d = Verteilungszustand des Ferments im Dunkeln, V_h = Verteilungszustand des Ferments im Licht.

Lichtwirkung: $\Delta V = V_h - V_d$.

In den Spalten für n und V sind die errechneten Mittelwerte der zwei entsprechenden Meßperioden eingetragen (z. B. $\frac{n_d(\text{vorn}) + n_d(\text{hinten})}{2} = n_d$).

$$L = \text{Lichtempfindlichkeit} = \frac{\frac{\Delta V}{V_d}}{J}.$$

$$\frac{\beta_{\lambda}}{\beta_{436}} = \frac{L_{\lambda}}{L_{436}} \cdot \frac{(\text{Energie eines Mols Quanten})_{\lambda_{436}}}{(\text{Energie eines Mols Quanten})_{\lambda}} = \frac{L_{\lambda}}{L_{436}} \cdot \frac{436}{\lambda}.$$

252

W. Kemper u. F. Kubowitz.

| Gasraum des Versuchs- gefäßes | Messung im Dunkeln oder während der Belichtung | Meßperiode Min. | Druckänderung während der Meßperiode | | \bar{n} (Mittel- werte) | $\frac{\bar{n}}{1-\bar{n}} = V$ (Mittelwerte) | $\frac{\Delta V}{V_d} = L$ | $\frac{\beta_{546}}{\beta_{436}}$ |
|-------------------------------------|---|--------------------|---|----------|---------------------------------|--|----------------------------|---|
| | | | mm Brodte | Σ | | | | |
| Argon | — | 3 3 3 | + 4,24 + 4,21 + 4,25 | + 12,70 | 1 | | | |
| 4 % CO in Argon | dunkel | 3 3 3 | + 1,12 + 1,12 + 1,15 | + 3,39 | 0,283 | $V_d = 0,395$ | | $= \frac{L_{546}}{L_{436}} \cdot \frac{436}{546}$ |
| | belichtet mit λ_{546} $J = 2,17 \cdot 10^{-2} \frac{\text{cal}}{\text{Min.} \cdot \text{qcm}}$ | 3 3 3 | + 1,39 + 1,42 + 1,44 | + 4,25 | 0,351 | $V_h = 0,541$ | $L_{546} = 17$ | $= \frac{17}{40} \cdot 0,8$ |
| | belichtet mit λ_{436} $J = 0,96 \cdot 10^{-2} \frac{\text{cal}}{\text{Min.} \cdot \text{qcm}}$ | 3 3 3 | + 1,42 + 1,40 + 1,38 | + 4,20 | 0,353 | $V_h = 0,546$ | $L_{436} = 40$ | $= 0,34$ |
| | belichtet mit λ_{546} $J = 2,17 \cdot 10^{-2} \frac{\text{cal}}{\text{Min.} \cdot \text{qcm}}$ | 3 3 3 | + 1,36 + 1,38 + 1,34 | + 4,08 | | | | |
| | dunkel | 3 3 3 | + 1,13 + 1,05 + 1,10 | + 3,28 | | | | |
| | — | 3 3 3 | + 3,66 + 3,67 + 3,74 | + 11,07 | | | | |

Biochemische Zeitschrift. 265. Bd. 4.—6. Heft.

| | |
|--|-------|
| <i>Fortsetzung des Inhaltsverzeichnis.</i> | Seite |
| Utewski, A. und S. Epstein. Unter Mitarbeit von W. Ossinskaja und E. Mima. Der intermediäre Stoffwechsel in den endokrinen Drüsen | 320 |
| Friedheim, E. A. H. und J. G. Baer. Untersuchungen über die Atmung von <i>Diphyllbothrium latum</i> (L.). Ein Beitrag zur Kenntnis der Atmungsfermente | 329 |
| Ettisch, G. und Günter Viktor Schulz. Über die Gültigkeit des Massenwirkungsgesetzes bei der Reaktion von Eiweißkörpern mit Säuren und Basen | 338 |
| — — Über die Sekundärreaktion zwischen Ovalbumin und Säure | 370 |
| Klenitzky, J. S. und E. G. Prokofiewa. Mitogenetische Spektralanalyse des Polysaccharidabbaus | 375 |
| Scheinfinkel, N. Prüfung der Frage des Nachweises von Gallensäuren im Blute mit Hilfe der spektrophotometrischen Methode | 380 |
| Bodnár, J. und Ladislaus Barta. Biochemische Untersuchung der Tabaktrocknung und -fermentation. III. Mitteilung: Entsteht während der Fermentation Ammoniak, Methylamin und Pyridin aus Nicotin? | 386 |
| Urbach, Carl. Beiträge zur stufenphotometrischen Mikroanalyse des Harnes und des Blutes. X. Mitteilung: Quantitative Bestimmung des Blutzuckers | 390 |
| Laskowski, M. Über die Bedingungen der Entstehung des Kolloid-Calcium-Phosphorkomplexes im Serum | 401 |
| Rosenthal, Otto. Über den Stoffwechsel heterotransplantierte Tumoren | 413 |
| Kaplanski, S. und N. Boldirewa. Über den Mineralstoffgehalt des Muskelgewebes von Süßwasserfischen bei gesteigerter Konzentration der Mineralsalze im Wasser | 422 |
| Jaitschnikow, I. S. Die Wechselwirkung zwischen Aminosäuren und Nicotin | 426 |
| Mardaschew, S. und M. Mogilewsky. Der Einfluß der mitogenetischen Strahlen auf fermentative Prozesse | 429 |
| Simonovits, Stefan. Über eine neue Mikro-Glykogenbestimmungsmethode | 437 |
| Monasterio, Gabriel. Die titrimetrische Mikrobestimmung des Cholesterins | 444 |
| Josephson, Bertil. Studien über die Aminosulfonsäuren. II. Mitteilung: Die Synthese einiger Taurinderivate | 448 |
| Autorenverzeichnis | 456 |

***Manometrische Untersuchungen über Stoffwechsel und Wachstum
von Bakterien unter dem Einfluss von ultraviolettem Licht
und unter den Bedingungen der Entzündung***

***[Manometric Studies to Determine the Effects of Ultraviolet Light and
Conditions of Inflammation on the Metabolism and Growth of Bacteria]***

Manometric Studies to Determine the Effects of Ultraviolet Light and Conditions of Inflammation on the Metabolism and Growth of Bacteria

by Ruth Lohmann

“Classical” bacteriological and chemical methods have provided us with fundamental and essential information about not only the morphology but also the physiology of bacteria. Only in one aspect are they unsatisfactory: by their very nature, these methods cannot answer any question whose solution depends on direct observation of the life processes of bacteria.

The manometric measurement of cell metabolism introduced by Warburg provided a method for direct observation of life processes—metabolism, reproduction, functioning—while they are taking place, in isolated cells including bacteria. In a closed manometric system even the smallest changes in gas pressures can be observed, and in this way all metabolic reactions involving formation or consumption of gases can be measured directly and quantitatively. Because the accuracy of these methods is sufficient to measure the metabolism of minute, very thin tissue sections, these methods are particularly suitable for studying the metabolism of bacteria. Only with them can growth also be observed directly and quantitatively.

These new manometric methods of cell physiology can also tackle medical-clinical problems and questions of practical bacteriology, such as the effects of toxins and hormones on metabolism and growth of body cells and bacteria. They are valuable above all for functional cellular pathology: the study of the effects of tissues changed by disease on organ cells, cancer cells, and bacteria.

Bacteria suspended in Ringer's solution do indeed survive, but do not grow—their constant respiration is expressed in a roughly horizontal line—whereas the respiration curve for bacteria suspended in bouillon rises very quickly. Once we have determined how bacteria grow under normal conditions, we can turn to the question of how bacteria grow under the influence of ultraviolet light. In bacteria irradiated for 45 minutes, metabolism decreases to less than half and remains at this level; thus, unlike the control group not exposed to radiation, they do not exhibit the metabolic increase characteristic of growth. If we continue to observe these bacteria, we see that after about 7-8 hours, growth begins anew. Bacteria depending on respiration and those depending on fermentation exhibit this same behavior. The bacteria cell repeatedly builds growth substance, so that after a shorter or longer time, depending on the duration of the radiation, the growth will begin again. Thus ultraviolet light does not cause “total sterilization,” but rather only “temporary castration.”

The investigation of the effects of inflammation on bacteria should take into account a few fundamental facts with regard to the energy-supplying reactions of bacteria and their reactions to oxygen. In general we understand energy-supplying reactions to

mean chemical reactions in the living cell through which the energy necessary to maintain life is obtained. If we group bacteria according to their reaction to oxygen, we have the following classification (which differs slightly from Pasteur's):

- (1) Strictly aerobic bacteria, i.e., those that can live and grow only in the presence of oxygen;
- (2) Facultative aerobic and anaerobic bacteria, i.e., those that can live and grow both in the presence or absence of oxygen;
- (3) Strictly anaerobic bacteria, which can live and grow only in the absence of oxygen.

If we study the influence on each of these categories of bacteria of an inflammatory milieu, i.e., an acid milieu containing hardly any oxygen and sugar, we find the following:

(1) The strictly aerobic bacteria, i.e., those that can only live through respiration, indeed will not die from lack of nutrient, since in addition to the oxidation of sugar, they also have the ability to burn fat and protein. But they will die from increasing anaerobiosis because the continuing inflammation seals out the oxygen needed for combustion of fat or protein.

(2) The bacteria that survive by cleavage of sugar fare no better than bacteria living by respiration: With progressing inflammation, the sugar content of the inflammatory milieu is equal to zero; consequently bacteria that can only cleave sugar, must die in this milieu.

Therefore, it is evident that the conditions of inflammation will result in the "death" of most bacteria, solely on the basis of energy requirements. Because the majority of bacteria survive by respiration or sugar cleavage or by both reactions in tandem, they can neither grow nor exert their harmful effects on the body when there is an interruption in these energy-supplying reactions.

(3) Only one group of bacteria achieves its pathogenic effect on the human body specifically through the conditions of inflammation. These are the strictly anaerobic bacteria, specifically those that do not attack carbohydrates as their sole energy source, but rather proteins. For these strict anaerobic bacteria, oxygen is a poison, i.e., in the presence of oxygen these bacteria do not grow but perish.

Conversely, the fact that an infection occurs with strictly anaerobic bacteria, e.g., tetanus, is itself evidence that strictly anaerobic conditions do exist in the body, that is, a complete—at any rate, functional—walling off of a particular diseased area from the healthy organism, with a change in concentration not only of solid substances but also of gases.

We have seen that metabolism and growth of bacteria are changed by both internal and external factors, and that under certain conditions respiration and cleavage of bacteria stop completely. Not all bacteria that have been without metabolism for a certain time are really dead in a biological sense; they can survive in a condition of *vita minima*, or, so

to speak, in hibernation or apparent death. Some bacteria can usually be cultured, e.g., from pus, which under optimal conditions again possess all the typical characteristics and effects of the specific bacteria type.

SONDERDRUCK AUS
**KLINISCHE
 WOCHENSCHRIFT**

ORGAN DER GESELLSCHAFT DEUTSCHER NATURFORSCHER UND ÄRZTE
 VERLAG VON JULIUS SPRINGER, BERLIN, UND J. F. BERGMANN, MÜNCHEN

JAHRG. 13

4. AUGUST 1934

Nr. 32, S. 1112/1116

**MANOMETRISCHE UNTERSUCHUNGEN ÜBER
 STOFFWECHSEL UND WACHSTUM VON BAK-
 TERIEN UNTER DEM EINFLUSS VON ULTRA-
 VIOLETTEM LICHT UND UNTER DEN
 BEDINGUNGEN DER ENTZÜNDUNG*.**

Von

RUTH LOHMANN.

Aus der II. Medizinischen Klinik der Charité Berlin
 (Direktor: Prof. Dr. G. v. BERGMANN).

Nicht nur über die Morphologie, sondern auch über die Physiologie der Bakterien haben uns die „klassischen“ bakteriologischen und chemischen Methoden die grundlegenden und wesentlichen Aufschlüsse gegeben. Nur in einer Richtung können sie nicht befriedigen, und zwar müssen sie notwendigerweise die Antwort schuldig bleiben auf alle Fragen, deren Lösung von der *direkten* Beobachtung der Lebensvorgänge der Bakterien abhängig ist. Das Kulturverfahren z. B. kann entscheiden, ob ein beimpfter Nährboden sich nach 12 oder 24 Stunden verändert hat, ob eine Kultur „angegangen“ ist oder nicht; ein Endzustand kann festgestellt werden, etwa die Vermehrung oder Verminderung der Keimzahl. Der *Weg bis* zu diesem Endzustand bleibt unerforscht, der eigentliche Lebensablauf einer Bakterienkultur, ihr *aktuelles Verhalten* in einem bestimmten Augenblick unter bestimmten Bedingungen. Was geschieht beispielsweise mit einer Bakterienkultur unter der Einwirkung eines Giftes? Werden alle Bakterien in derselben Weise partiell geschädigt oder wird die Mehrzahl abgetötet und bleiben einzelne aus irgendwelchen Gründen von der schädigenden Einwirkung verschont und bedingen ein erneutes Wachstum? Welches ist überhaupt der *Mechanismus* einer solchen schädigenden oder fördernden Wirkung auf einen so komplexen Vorgang wie das Wachstum einer Bakterienkultur, welche lebenswichtige Reaktion der Bakterienzelle wird beispielsweise durch die Einwirkung eines solchen Giftes verändert? Das sind zentrale Fragen nicht nur für die Physiologie der Bakterien selbst, die mit den üblichen bakteriologischen Methoden nicht beantwortet werden konnten.

* Ausgeführt mit Unterstützung der Notgemeinschaft der Deutschen Wissenschaft.

— 2 —

Eine Methode, die Lebensvorgänge — Stoffwechsel, Vermehrung, Funktion — während ihres Ablaufs an isolierten Zellen, also auch an Bakterien, direkt zu beobachten, hat WARBURG eingeführt mit der manometrischen Messung des Zellstoffwechsels. In einem geschlossenen Manometersystem werden auch kleinste Veränderungen des Gasdrucks festgestellt und auf diese Weise direkt und quantitativ alle Stoffwechselreaktionen gemessen, die mit einer Bildung oder einem Verbrauch von Gasen verbunden sind (z. B. Sauerstoffverbrauch und Kohlensäurebildung bei der Atmung, Wasserstoffbildung bei verschiedenen Gärungen). Aber auch andere an sich nicht gasförmige Stoffwechselreaktionen sind ebenfalls manometrisch zu messen, indem sie in geeigneter Weise mit Gasreaktionen gekoppelt werden (z. B. die Milchsäurebildung nach Zusatz von Natriumbicarbonat zur Suspensionsflüssigkeit aus der bei der Säurebildung freiwerdenden Kohlensäure). Die Methoden, deren Genauigkeit ausreicht, den Stoffwechsel kleinster, hauchdünner Gewebeschnitte zu messen, sind zur Untersuchung gerade des Stoffwechsels von Bakterien besonders geeignet. Auch das Wachstum kann mit ihnen — und nur mit ihnen — direkt und quantitativ beobachtet werden; es ist durch die Zunahme der Gasdruckänderungen gekennzeichnet, die sonst als Ausdruck des Stoffwechsels allein in gleichen Zeiträumen gleich bleiben. Absolute Stoffwechselzahlen (Leistungen pro Milligramm Substanz) lassen sich durch Wägung der in geeigneten Zentrifugengläsern zentrifugierten Bakterien leicht bestimmen, bei wachsenden Bakterien, nachdem das weitere Wachstum durch Abkühlung oder Narkotica verhindert ist.

Zahlreiche Untersuchungen von großer theoretischer Wichtigkeit sind mit den manometrischen Methoden an Bakterien bereits ausgeführt worden; es sei nur erinnert an die Arbeiten von WARBURG selbst mit Hefebakterien, die Aufschluß brachten über die chemische Konstitution des Atmungsferments, und an die Arbeiten mit Buttersäurebakterien von W. KEMPNER, der in unserer Klinik die Wirkung des Kohlenoxyds auf die Gärung entdeckte und zum erstenmal das Absorptionsspektrum eines Gärungsfermentes messen konnte. Aber auch ärztlich-klinische Probleme und Fragen der praktischen Bakteriologie können mit den neuen zellphysiologischen Methoden angegriffen werden: die Wirkungen von Giften und Hormonen auf Stoffwechsel und Wachstum von Körperzellen und Bakterien und vor allem als „funktionelle Zellpathologie“: die Wirkung des durch Krankheit veränderten Gewebes auf Orgazellen, Krebszellen und Bakterien. Solche Wirkungen experimentell quantitativ festzustellen, war auch das Ziel dieser Arbeit, und zwar wurden zwei besonders typische Beispiele ausgewählt: als Wirkung eines körperfremden Faktors der Einfluß des ultravioletten Lichtes und als Wirkung eines körpereigenen Faktors der Einfluß der Entzündung auf Stoffwechsel und Wachstum der Bakterien.

I.

Über die Frage, wie eigentlich das Wachstum der Bakterien im einzelnen verläuft, ob kontinuierlich oder diskontinuierlich, besteht keine übereinstimmende Meinung. Eine Klärung ist nur durch die manometrische Beobachtung zu erlangen, die es erlaubt, das Wachstum von Minute zu Minute zu verfolgen.

Suspendiert man beispielsweise von einer 24 Stunden alten Bakterienkultur gleiche, geringe Mengen (etwa einem Trockengewicht von 0,2 mg entsprechend, was natürlich bei verschiedenen Bakterienarten je nach der Atmungsgröße wechselt) in Ringer-Zucker-Phosphat-Lösung vom p_H 7,4 einerseits, in Zuckerbouillon-Phosphat ebenfalls vom p_H 7,4 andererseits, gibt zur Absorption der gebildeten Kohlensäure Kalilauge in den Gefäßanhang, sättigt das Gefäß mit Luft und schüttelt bei 37° im Thermostaten, so kann man aus den manometri-

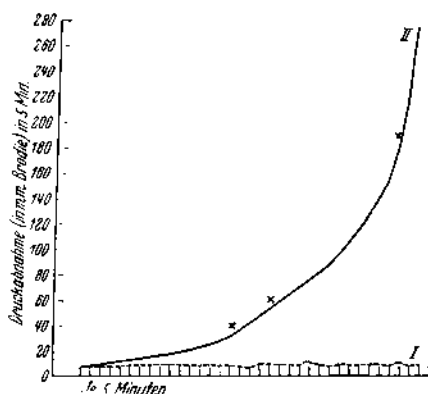


Abb. 1. Atmung von Coli-Bacillen. I in Ringerlösung, nicht wachsend, II in Bouillon, wachsend. (Die Kreuze bezeichnen die Verdünnung der Kultur.)

schen Druckänderungen unmittelbar die jeweiligen Atmungsgrößen der Bakterien ablesen.

In der graphischen Aufzeichnung (Abb. 1) sind als Ordinaten die in 5-Minuten-Ablesungen gewonnenen Atmungswerte — gemessen am Sauerstoffverbrauch — eingetragen. Während die in Ringerlösung suspendierten Bakterien eine etwa horizontale Linie als Ausdruck der gleichbleibenden Atmung zeigen — in Ringerlösung können die Bakterien zwar leben, aber nicht wachsen —, steigt die Kurve für die in Bouillon suspendierten Bakterien rasch zunehmend an. Dabei muß, um die genaue Beobachtung der späteren, rasch zunehmenden Werte zu ermöglichen, mehrmals ein Teil der Flüssigkeit — und damit der entsprechende Teil an Bakterien — aus dem Suspensionsgefäß herauspipettiert und durch bakterienfreie Suspensionsflüssigkeit ersetzt werden. Denn überschreiten die Stoffwechselumsetzungen eine gewisse Grenze, so ist der Gasaustausch zwischen Suspensionsflüssigkeit und

— 4 —

Manometergasraum nicht mehr vollständig, und die gemessenen Werte entsprechen nicht den Stoffwechselvorgängen, da die Methode das Bestehen eines absoluten Gasgleichgewichts zwischen Flüssigkeit und Gasraum zur Voraussetzung hat. Die abgelesenen Drucke müssen dann entsprechend multipliziert werden. Durch dieses Vorgehen wird zugleich eine Veränderung der Versuchsbedingungen während des Versuchs vermieden, die sonst bei längerer Versuchsdauer durch die entsprechend der Vermehrung der Bakterien zunehmenden Stoffumsetzungen herbeigeführt würde und eine Änderung im Verhalten der Bakterien bedingen könnte.

Bei Abb. 1 handelt es sich um eine schnell wachsende Kultur von Colibacillen. Die Stellen, wo die Kultur verdünnt wurde, sind durch Kreuze gekennzeichnet. An der Stelle des ersten Kreuzes wurden 0,5 ccm der Bakteriensuspension, die insgesamt 1 ccm betrug, herauspipettiert, 1 ccm bakterienfreier Suspensionsflüssigkeit dazu gegeben. Die abgelesenen Drucke sind also von da an mit 2 zu multiplizieren. An der

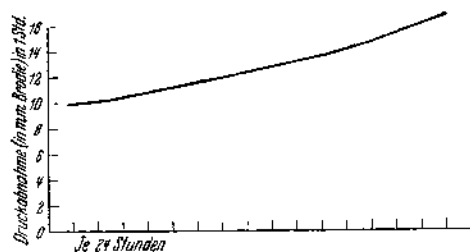


Abb. 2. Atmung einer in Lockemann-Flüssigkeit wachsenden Tuberkelbacillenkultur.

Stelle des zweiten Kreuzes wurde 1 ccm herauspipettiert und wieder auf 1,5 ccm aufgefüllt, an der Stelle des dritten Kreuzes ebenso, so daß die Drucke nun insgesamt mit $2 \cdot 3 \cdot 3 = 18$ zu multiplizieren waren. Man sieht aus der Abbildung, wie die experimentell gefundenen Werte auf einer regelmäßigen Kurve liegen. Entsprechende Kurven ergaben sich für alle untersuchten Bakterien mit ähnlicher Wachstumsgeschwindigkeit.

Aber auch wenn die Wachstumsgeschwindigkeit sich ändert, bleibt die Form der Kurve im Prinzip die gleiche, was z. B. Abb. 2 veranschaulicht, wo es sich um eine Bakterienkultur mit extrem langsamer Vermehrung handelt (Tuberkelbacillen). Hier wurden als Ordinaten die aus einer Beobachtung von jeweils mehreren Stunden sich durchschnittlich für eine Stunde ergebenden Atmungswerte, wieder am Sauerstoffverbrauch gemessen, eingetragen. Da Stoffwechsel und Wachstum der Tuberkelbacillen sehr träge sind, erstreckte sich der einzelne Versuch über 3–4 Wochen. Die Kurve stellt gewissermaßen ein Zeitlupenbild vom ersten Abschnitt der anderen dar. Aber auch hier verläuft das Wachstum durchaus gleichmäßig; alle Werte liegen auf einer Linie. Von irgendwelchen periodischen Schwankungen, die die Theorie von einem diskontinuierlichen

— 5 —

Wachstum der Bakterien experimentell begründen würden, ist bei dieser Versuchsanordnung nichts zu bemerken.

II.

Nachdem festgestellt ist, wie das Wachstum der Bakterien unter normalen Bedingungen verläuft, können wir uns der Frage zuwenden: Wie verläuft das Wachstum der Bakterien unter dem Einfluß von ultraviolettem Licht? Die bactericide Wirkung der ultravioletten Strahlen ist seit langem bekannt; in der vorliegenden Arbeit interessiert das *Zustandekommen* der Bactericidie: Wie verhalten sich die Bakterien in ihren wichtigsten vitalen Reaktionen während und nach der Bestrahlung? Ich habe Atmung und Gärung nichtwachsender und wachsender aerober und anaerober Bakterien während und nach der Strahleneinwirkung gemessen.

Damit ultraviolette Strahlen die Bakterien erreichen, muß das Versuchsgefäß aus Quarz und die Menge der Suspensionsflüssigkeit relativ gering sein. Durch das regelmäßige Schütteln der Manometergefäße wird eine gleichmäßige Wirkung des Lichts auf alle Bakterien erzielt. Das Kontrollgefäß besteht aus Glas, um die darin befindlichen Bakterien, die sonst unter genau denselben Versuchsbedingungen gehalten sind, vor den ultravioletten Strahlen zu schützen. Als Lichtquelle ist zur Erzeugung der groben Lichteffekte eine Quecksilberdampfampe ausreichend, die aus einer konstanten Entfernung von 50 cm auf die Versuchsgefäße einwirkt. Zur Feststellung des genauen Zerstörungsspektrums des „Wachstumsstoffes“ ist natürlich die Bestrahlung mit isolierten Wellenlängen gemessener Intensität notwendig.

Zur Durchführung der Versuche wurden 24 Stunden alte Bakterienkulturen verwendet. Die Kulturbouillon wurde im Verhältnis 1 : 10 mit frischer Nährlösung verdünnt (einer fast farblosen Bouillon-Ringer-Zuckerlösung, um eine größere Lichtabsorption zu vermeiden). Von dieser jedesmal frisch hergestellten Bakteriensuspension wurde je 1 ccm (ungefähr 0,2 mg Bakterientrockensubstanz enthaltend) in Kegelgefäße aus Quarz und Glas pipettiert. Dazu wurde als Puffer je 0,2 ccm Phosphatgemisch nach SÖRENSEN vom p_H 7,4 gegeben. Mit der Bestrahlung wurde solange gewartet, bis man sich von der Übereinstimmung des gerade beginnenden Wachstums in allen Gefäßen überzeugen konnte.

Um sicher zu gehen, daß die beobachteten Wirkungen des ultravioletten Lichts direkte Wirkungen auf die Bakterien selbst sind und nicht durch Veränderungen der Nährflüssigkeit zustande kommen, wurde bakterienfreie Bouillon-Ringerlösung bestrahlt und das Verhalten der Bakterien in der bestrahlten und in unbestrahlter Nährflüssigkeit verglichen: ein Unterschied ergab sich nicht.

Bestrahlt man die Bakterien 45 Min. lang, so sinkt der Stoffwechsel auf weniger als die Hälfte ab und bleibt auf dieser Höhe, zeigt also nicht weiter den für das Wachstum charak-

— 6 —

teristischen Anstieg der Stoffwechselwerte wie bei der von den Strahlen nicht getroffenen Kontrolle. Beobachtet man die Bakterien längere Zeit hindurch, so sieht man, daß nach etwa 7–8 Stunden das Wachstum wieder beginnt. Dieses Verhalten zeigen atmende und gärende Bakterien in gleicher Weise (Abb. 3 und 4).

Bestrahlt man die Bakterien 80 Min. lang, so sinkt der Stoffwechsel stärker ab, praktisch beinahe auf Null; aber auch hier beginnt schließlich etwa nach 12 Stunden das Wachstum von neuem. Selbst nach einer Bestrahlung von $3\frac{1}{2}$ Stunden sind die Bakterien nicht, wie das Aufhören des Stoffwechsels zuerst vermuten läßt, vollkommen tot; nach ungefähr 20 Stunden beginnen auch diese Bakterien wieder zu wachsen.

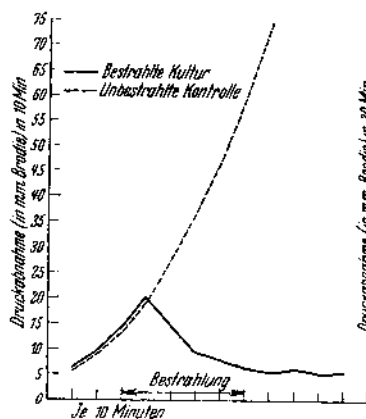


Abb. 3. Atmung von Streptokokken unter dem Einfluß von 45 Minuten langer Bestrahlung mit ultraviolettem Licht.

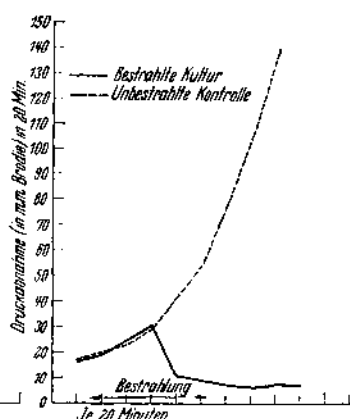


Abb. 4. Gärung von Streptokokken unter dem Einfluß von 45 Minuten langer Bestrahlung mit ultraviolettem Licht.

Wiederholte Bestrahlung, etwa alle 5 Stunden, und stärkere Bestrahlungsintensitäten bewirken natürlich den absoluten Tod der Bakterien, das Zelleiweiß wird irreversibel zerstört. Aber ein interessanteres Phänomen zeigt sich, wenn man im Gegenteil die Bestrahlungsintensität möglichst vermindert. Bestrahlt man nach der oben beschriebenen Versuchsanordnung lediglich 1–3 Min., so kommt man in einen Bereich, wo der Stoffwechsel der Bakterien vollkommen konstant bleibt, aber das Wachstum aufhört.

In Abb. 5 sind die Wirkungen des ultravioletten Lichts bei 16, 7 und 3 Min. langer Bestrahlung zusammengestellt: Bei Bestrahlung von 16 Min. sinkt der Stoffwechsel auf die Hälfte, das Wachstum beginnt wieder nach etwa 5 Stunden, Bestrahlung von 7 Min. bewirkt ein Absinken des Stoffwechsels um etwa ein Viertel, das Wachstum beginnt wieder nach 3 Stunden. Bestrahlung von 3 Min. läßt den Stoffwechsel voll-

— 7 —

kommen konstant, das Wachstum wird für ungefähr 2 Stunden unterdrückt. (Dies Konstantbleiben des Stoffwechsels ergibt sich nicht etwa daraus, daß Absterben eines Teils der Bakterien und gleichzeitige Vermehrung eines anderen Teils sich die Waage halten: denn bei entsprechender Bestrahlung von Bakterien in Ringerlösung — wo ein Wachstum nicht stattfindet — ist kein Absinken der Stoffwechselzahlen zu beobachten.)

Wie aus Kurve III der Abb. 5 hervorgeht, sind also Bakterienwachstum und -stoffwechsel gegen ultraviolette Strahlen in verschiedener Weise empfindlich. Die energieliefernden Reaktionen bleiben bei einer bestimmten Bestrahlungsintensität unbeeinflusst, während das Wachstum aufhört. Der Stoff, der das Wachstum der Zelle bedingt, ist also nicht identisch mit den Stoffen, die Atmung und Gärung bewirken, sondern ist eine Substanz, die ultraviolettes Licht anders

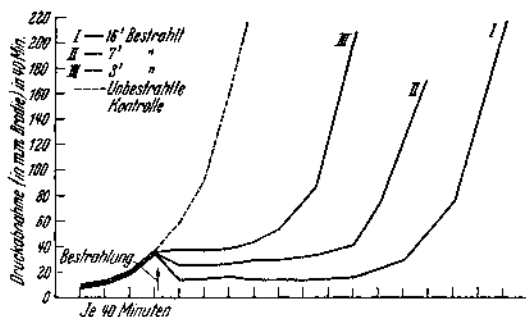


Abb. 5. Atmung von Colibacillen unter dem Einfluß von 3,7 und 16 Minuten langer Bestrahlung mit ultraviolettem Licht.

absorbiert als das Atmungs- und Gärungsferment; und so ist es möglich, intra vitam diesen Wachstumsstoff von den beiden Stoffwechselerfermenten zu isolieren.

Die Bakterienzelle baut diesen Wachstumsstoff immer wieder von neuem auf, so daß nach kürzerer oder längerer Zeit, abhängig von der Dauer der Strahleneinwirkung, das Wachstum wieder beginnt. Das ultraviolette Licht bewirkt also nicht eine „totale Sterilisierung“, sondern nur eine „temporäre Kastration“.

III.

Um auch die Wirkung von Röntgenstrahlen auf Bakterien zu beobachten, habe ich Tuberkelbacillenkulturen mit starken Röntgendosen bestrahlt. In 2 Manometerkegelgefäße wurde (wegen der langen Versuchsdauer unter besonders strenger Einhaltung der Sterilität) je 1 ccm einer Tuberkelbacillenaufschwemmung in Lockemann-Flüssigkeit gefüllt und der Stoffwechsel 2 Tage lang gemessen. Dann wurde das eine Versuchsgefäß so unter eine Röntgenröhre gestellt, daß die Stelle der stärksten Wirksamkeit der Strahlen gerade in die

— 8 —

Bakterienaufschwemmung fiel. Nach einer Einwirkung der Strahlen von 80 Min. wurde Stoffwechsel und Wachstum 4 Wochen lang beobachtet. Abb. 6 veranschaulicht die Ergebnisse: Weder Stoffwechsel noch Wachstum zeigt irgendeine Beeinflussung durch Röntgenstrahlen, die bestrahlte Kultur verhält sich genau so wie die unbestrahlte Kontrolle.

Für die oft diskutierte Frage, ob die bekannte Wirksamkeit der Röntgenstrahlen auf tuberkulöses Gewebe durch eine direkte Schädigung der Tuberkelbacillen bedingt ist, zeigt dieser Versuch, daß eine direkte Wirkung der Röntgenstrahlen auf Tuberkelbacillen nicht stattfindet.

IV.

Nachdem am Beispiel der Strahlenwirkung der Einfluß eines „äußeren“ Agens auf Stoffwechsel und Wachstum der Bakterien gezeigt wurde, soll nun am Beispiel der Entzündung untersucht werden die Beeinflussung von Wachstum und

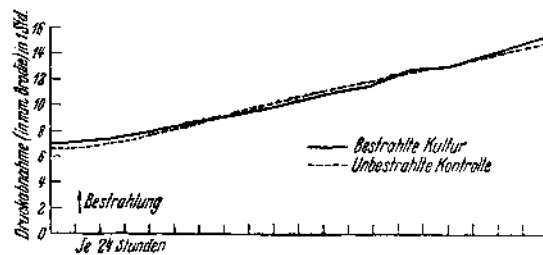


Abb. 6. Atmung und Wachstum von Tuberkelbacillen in Lockemann-Flüssigkeit nach 80 Minuten langer Röntgenbestrahlung.

Stoffwechsel der Bakterien durch einen pathologischen Zustand des menschlichen Körpers selbst.

Die anatomischen und klinisch-symptomatischen Erscheinungen der Entzündung sind lange bekannt. Die biologischen Zusammenhänge und Gründe dieser Erscheinungen konnten aber erst erfaßt werden durch die Kenntnis der *physikalisch-chemischen Veränderungen* am Orte der Entzündung, und auch die Wirkung des Entzündungsvorganges auf die Bakterien selbst, die Erreger der meisten Entzündungsprozesse, kann nur von diesem Gesichtspunkt aus betrachtet werden.

Die chemisch-physikalischen Veränderungen am Ort der Entzündung sind, wie KEMPNER und PESCHER nachgewiesen haben, bedingt durch den Stoffwechsel der entzündlichen Zellen: Verarmung des Entzündungsraumes an Sauerstoff und energieliefernder Substanz bis zur Anaerobiose und zum praktisch völligen Verschwinden des Zuckers, Sinken des p_H infolge Vermehrung der Milchsäure und Abnahme des Bicarbonats. Damit diese physikalisch-chemischen Veränderungen zustande kommen können, muß das Gleichgewicht der Stoffe, das sonst überall im Körper mit außerordentlicher Genauigkeit gewahrt

— 9 —

wird, durch eine funktionelle Abriegelung des Entzündungsbereichs vom übrigen Gewebe gestört sein, wie sie in ihrer stärksten Ausbildung als membranöse Abkapselung z. B. eines Abscesses seit je bekannt ist. Selbstverständlich gibt es neben dem Zustand der vollständigen Anaerobiose, dem völligen Zuckermangel, der starken Verschiebung des p_H nach der sauren Seite, der beträchtlichen Bicarbonatverarmung im Entzündungsbereich alle fließenden Übergänge bis zum Normalen, aber um den Einfluß der Entzündungsfaktoren grundsätzlich festzulegen, ist es notwendig, vom „Idealfall“ auszugehen, den maximalen Veränderungen am Ort der Entzündung.

Der Untersuchung über die Wirkungen der Entzündung auf Bakterien seien noch einige prinzipielle Bemerkungen vorausgeschickt hinsichtlich der energieliefernden Reaktionen der Bakterien und ihres Verhaltens gegen Sauerstoff. Unter energieliefernden Reaktionen versteht man allgemein diejenigen chemischen Umsetzungen der lebenden Zelle, durch die die zur Erhaltung des Lebens notwendige Energie gewonnen wird. Als wesentlichste Energiequellen gelten Atmung — d. h. Oxydation von Fett, Eiweiß und Zucker — und Gärung — d. h. Spaltung, z. B. von Zucker, ohne Beteiligung von Sauerstoff. Die Entdeckung der anaeroben Gärung, die den alten Lavoisierschen Satz „Kein Leben ohne Sauerstoff“ widerlegte, verdanken wir PASTEUR; von ihm stammt auch die klassische Einteilung der Bakterien nach der Art ihrer Energiegewinnung. Danach unterscheidet man:

- A. Die Bakterien, die ihre Energie durch Atmung gewinnen.
- B. Die Bakterien, die durch beide Reaktionen, Atmung und Spaltung, ihre Energie gewinnen können, und
- C. Die Bakterien, die ihre Energie nur durch Spaltung gewinnen.

Gruppiert man die Bakterien nach ihrem Verhalten gegen Sauerstoff, so sind zu unterscheiden:

1. Die strengen Aerobier, d. h. die Bakterien, die lediglich bei Anwesenheit von Sauerstoff leben und wachsen können.
2. Die fakultativen Aerobier und Anaerobier, d. h. die Bakterien, die sowohl bei Gegenwart wie Abwesenheit von Sauerstoff leben und wachsen können.
3. Die strengen Anaerobier, die lediglich bei Abwesenheit von Sauerstoff leben und wachsen können.

Diese Einteilung ist mit der oben wiedergegebenen Pasteurschen nicht identisch. Zwar entspricht die Gruppe I der Gruppe A; doch enthält Gruppe II mehr als Gruppe B, nämlich noch einen Teil der nur spaltenden der Gruppe C, diejenigen Anaerobier, die den Sauerstoff zwar nicht verwenden, denen seine Anwesenheit aber auch nichts schadet. Die übrigen Bakterien der Gruppe C — der nur spaltenden — bildet die Gruppe III, das sind die Bakterien, die bei Sauerstoffanwesenheit zugrunde gehen.

— IO —

Untersucht man den Einfluß eines entzündlichen, d. h. eines kaum noch Sauerstoff und Zucker enthaltenden, sauren Milieus auf Bakterien, so ergeben sich nach den verschiedenen Arten der Energiegewinnung und dem verschiedenen Verhalten gegen Sauerstoff notwendig folgende Wirkungen auf die verschiedenen Bakteriengruppen:

Die strengen Aerobier, d. h. die Bakterien, die nur durch Atmung leben können (Gruppe I), werden zwar aus Mangel an Nahrungsmaterial nicht zugrunde gehen, da sie neben der Oxydation von Zucker noch die Möglichkeit haben, Fette und Eiweißkörper zu verbrennen. Sie müssen aber zugrunde gehen infolge der mit fortschreitender Entzündung zunehmenden Anaerobiose, da sie durch den Abschluß des Entzündungsraumes den zur Fett- oder Eiweißverbrennung notwendigen Sauerstoff nicht mehr erhalten.

Den spaltenden Bakterien, soweit sie lediglich Zucker spalten, bietet die Entzündung keineswegs günstigere Bedingungen als den atmenden Bakterien: Denn mit fortschreitender Entzündung wird der Zuckergehalt des entzündlichen Milieus gleich Null, infolgedessen müssen die Bakterien, die lediglich Zucker spalten können, im Milieu der Entzündung absterben.

Es ist also deutlich, daß allein nach den Gesetzen des Energiebedarfs die Bedingungen der Entzündung den „Tod“ der meisten Bakterien herbeiführen. Denn der größte Teil der Bakterien lebt durch Atmung oder Zuckerspaltung oder durch beide Reaktionen nebeneinander und kann daher weder wachsen noch seine für den Körper schädlichen Wirkungen ausüben, wenn diese energieliefernden Reaktionen, die die Voraussetzung der Tätigkeit aller Lebewesen bilden, unterbrochen werden.

Nur eine Bakteriengruppe gibt es, die geradezu erst durch die Bedingungen der Entzündung ihre Pathogenität für den menschlichen Körper erhält. Dies ist die Gruppe der strengen Anaerobier, und zwar derjenigen, die als Energiequelle nicht nur Kohlehydrate, sondern Eiweißstoffe angreifen. Für die strengen Anaerobier ist der Sauerstoff ein Gift, d. h. diese Bakterien wachsen nicht bei Sauerstoffanwesenheit, sondern gehen zugrunde. Im gesunden Körper gibt es für diese Krankheitserreger keine Lebens- und Wachstumsmöglichkeiten; denn überall ist das Gewebe mit Sauerstoff gesättigt und deshalb tödlich für Bakterien, denen der Sauerstoff schadet. Die Entzündung aber führt zur völligen Sauerstoffverarmung des erkrankten Gewebes, und hier im Entzündungsgebiet einzig und allein sind die Voraussetzungen gegeben, unter denen die strengen Anaerobier ihren optimalen Stoffwechsel ausüben können und wachsen. Könnten diese Bakterien nur durch Spaltung des Zuckers ihre Energie gewinnen, so kämen keine durch strenge Anaerobier hervorgerufenen Infektionskrankheiten zustande; denn wie wir gesehen haben, geht der Zu-

— II —

nahme der Anaerobiose eine Abnahme des Zuckers im Entzündungsbereich parallel.

Wie aber Abb. 7 zeigt, ist diese Gruppe der strengen Anaerobier, z. B. der *Bacillus tetani*, der wohl für die menschliche Pathologie wichtigste obligate Anaerobier, imstande, in einem lediglich eiweißhaltigen Milieu sich ausgezeichnet zu vermehren (Abb. 7). Bei Sauerstoffgegenwart aber sterben diese Bakterien ab; sie bilden mit dem Sauerstoff sozusagen ein Gift, dessen mit fortschreitender Einwirkung des Sauerstoffs zunehmende Konzentration schließlich den Stoffwechsel verhindert. Bringt man solche Bakterien, die der Einwirkung

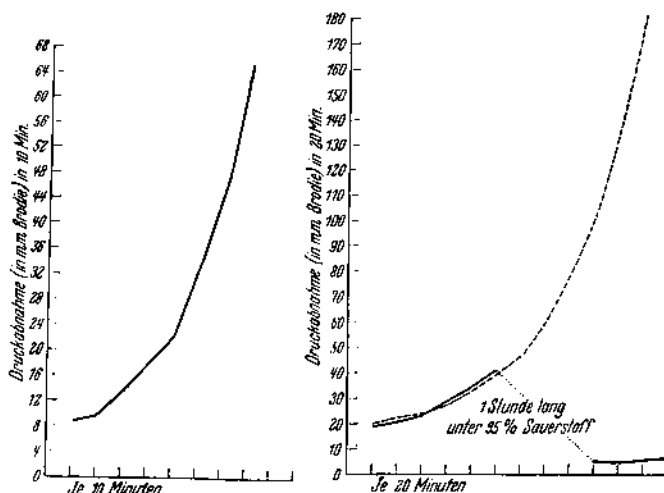


Abb. 7. Wachstum von Tetanusbakterien in zuckerfr. Ringer-Peptonlösung.

Abb. 8. Sauerstoffwirkung auf die Gärung von Tetanusbacillen.

des Sauerstoffs beispielsweise 1 Stunde lang ausgesetzt waren, wieder in streng anaerobe Verhältnisse, so sieht man, wie ihr Stoffwechsel nur einen Bruchteil beträgt vom Stoffwechsel der Bakterien, die unter sonst gleichen Bedingungen bei Sauerstoffabschluß gelebt haben (Abb. 8).

Umgekehrt ist die Tatsache des Vorkommens einer Infektion mit streng anaeroben Bakterien, z. B. Tetanus, allein schon ein Beweis dafür, daß es im Körper überhaupt streng anaerobe Verhältnisse gibt, also einen völligen, jedenfalls funktionellen Abschluß irgendeines erkrankten Gebietes vom übrigen, gesunden Organismus, mit einer Veränderung in der Konzentration nicht nur der festen Substanzen, sondern sogar der Gase.

V.

Wir haben gesehen, wie Stoffwechsel und Wachstum von Bakterien durch die Einwirkung körperfremder und körpereigener Faktoren verändert werden, und daß unter bestimm-

ten Bedingungen die Bakterien sogar vollständig aufhören zu atmen und zu spalten. Freilich ist es nicht notwendig, daß alle Bakterien, die eine bestimmte Zeit lang keinen Stoffwechsel gehabt haben, auch im biologischen Sinne endgültig abgestorben sind; sie können im Zustand einer *vita minima*, sozusagen in einem Winterschlaf oder Scheintod überdauern. Fast immer lassen sich z. B. aus Eiter noch Bakterien herauszüchten, die unter optimalen Bedingungen wieder alle typischen Eigenschaften und Wirkungen der betreffenden Bakterienart besitzen. Sogar aus einem so abgekapselten Milieu wie dem verkalkter tuberkulöser Drüsen gelingt es, virulente Tuberkelbacillen zu kultivieren. *Wie* ein solcher Scheintod eines *Bacterium*s bei völliger Abwesenheit jeder energieliefernden Reaktion möglich ist, ist ebenso rätselhaft wie die Fähigkeit eines Getreidekorns, nach jahrtausendlangem Liegen in einer ägyptischen Grabkammer unter günstigen Lebensbedingungen wieder aufzukeimen.

Maßgebend für den Zustand des Organismus ist aber nicht so sehr die manchen Bakterien erhalten bleibende potentielle Fähigkeit zur Wiederaufnahme ihres Stoffwechsels und damit ihrer Pathogenität als vielmehr ihr augenblickliches Verhalten. Denn Bakterien, die beispielsweise im Milieu eines abgeschlossenen Kalkherdes oder innerhalb einer entzündlichen Flüssigkeit wegen Sauerstoffentziehung und Zuckerverarmung ihren Stoffwechsel nicht ausüben können, sind eben für den Gesamtorganismus praktisch unschädlich, vom Standpunkt des Bakteriologen aus aber lebende und virulente Krankheitserreger. Der Kliniker, den vor allem die Bedeutung der Bakterien für den menschlichen Körper interessiert, kann sich daher nicht mit Methoden begnügen, die nur entscheiden, ob Bakterien vollständig tot sind oder ob sie noch die Fähigkeit haben, unter optimalen Bedingungen ein erneutes Wachstum zu beginnen; die aber nichts darüber aussagen, in welchem jeweiligen „offensiven“ oder „defensiven“ Zustand sich die Bakterien befinden.

Zur Beantwortung dieser für das ärztliche Handeln entscheidenden Frage wäre es wichtig, neben den gebräuchlichen bakteriologischen Methoden auch die Methoden der zellphysiologischen Stoffwechselformung zu verwenden, um nicht nur den potentiellen Fähigkeiten und Möglichkeiten der Bakterien nachzugehen, sondern ihr wirkliches, aktuelles Verhalten unter bestimmten, experimentell oder klinisch gegebenen Bedingungen festzustellen.

***Wirkung des Kohlenoxyds auf die Gärung
von Tetanus- und Gasbrandbazillen
[Effect of Carbon Monoxide on Fermentation of
Tetanus and Clostridium Welchii Bacteria]***

**Effect of Carbon Monoxide on Fermentation of
Tetanus and *Clostridium Welchii* Bacteria
by Clotilde Schlayer**

Kempner showed that the enzyme of butyric acid fermentation is inhibited reversibly by carbon monoxide (CO) and must therefore be a heavy-metal enzyme.

This paper reports a study of anaerobic pathogenic bacteria. We studied the effect of CO on the anaerobic fermentation of tetanus and *Clostridium welchii* [c. *perfringens*] bacteria. We found that (1) CO inhibited the fermentation, so a heavy-metal enzyme is involved; (2) the inhibition by CO is light sensitive, so the heavy-metal enzyme must be an iron-containing enzyme.

Biochemische Zeitschrift

Unter Mitwirkung von

E. Abderhalden-Halle a. d. S., M. Ascoli-Palermo, L. Asher-Bern, E. Aubel-Paris, A. Bach-Moskau, G. Barger-Edinburgh, M. Bergmann-New York, G. Bertrand-Paris, A. Bickel-Berlin, Fr. Boas-München, J. Bodnár-Debreczen, A. Bonanni-Rom, F. Bottazzi-Neapel, G. Bredig-Karlsruhe i. B., Wl. Butkewitsch-Moskau, T. Chrząszcz-Posen, M. Cremer-München, R. Doerr-Basel, A. Durig-Wien, R. Ege-Kopenhagen, F. Ehrlich-Breslau, H. v. Euler-Stockholm, M. Ferreira de Mira-Lissabon, S. Flexner-New York, A. Fodor-Jerusalem, J. Forssman-Lund, E. Freund-Wien, H. Freudlich-London, E. Friedmann-Cambridge, Cl. Fromageot-Lyon, O. Fürth-Wien, E. Hammarsten-Stockholm, F. Hayduck-Berlin, E. Hägglund-Stockholm, V. Henri-Lüttich, V. Henriques-Kopenhagen, K. Hess-Berlin, W. Heubner-Berlin, R. Höber-Philadelphia, M. Jacoby-Berlin, P. Karrer-Zürich, B. Kisch-Köln, G. Klein-Heidelberg, W. Klein-Bonn, A. J. Kluyver-Delft, M. Kochmann-Halle a. d. S., H. Kraut-Dortmund, R. Krimberg-Riga, E. Laqueur-Amsterdam, O. Lemmermann-Berlin, P. A. Levene-New York, A. Loewy-Davos, K. Lohmann-Heidelberg, H. Lüers-München, Th. Madsen-Kopenhagen, E. Mangold-Berlin, L. Marchlewski-Krakau, P. Mayer-Karlsbad, A. Mc Kenzie-Dundee, Kurt H. Meyer-Gent, O. Meyerhof-Heidelberg, L. Michaelis-New York, H. Molisch-Wien, W. Nernst-Berlin, K. Noack-Berlin, C. v. Noorden-Wien, Oria-Jensen-Kopenhagen, W. Ostwald-Leipzig, A. Palladin-Charkow, J. K. Parnas-Lemberg, W. Pauli-Wien, W. H. Peterson-Madison, R. Pfeiffer-Breslau, E. P. Pick-Wien, J. Pohl-Hamburg, Ch. Porcher-Paris, D. N. Prianischnikow-Moskau, H. Pringsheim-Berlin, St. J. von Przylecki-Warschau, A. Rippel-Göttingen, P. Rona-Berlin, H. Sachs-Heidelberg, T. Sasaki-Tokio, B. Sbarsky-Moskau, A. Scheunert-Leipzig, E. Schmitz-Breslau, J. Snapper-Amsterdam, S. P. L. Sörensen-Kopenhagen, J. Stoklasa-Prag, W. Straub-München, H. Steenbock-Madison, U. Suzuki-Tokio, K. Thomas-Leipzig, F. Verzar-Basel, A. I. Virtanen-Helsingfors, O. Warburg-Berlin, H. J. Waterman-Delft, G. v. Wendt-Helsingfors, E. Widmark-Lund, A. Wohl-Danzig, J. Wohlgemuth-Berlin, N. Zelinsky-Moskau

herausgegeben von

C. Neuberg und W. Grassmann

Berlin-Dahlem

Dresden

Sonderabdruck aus 276. Band, 5.—6. Heft

C. Schlayer:

**Wirkung des Kohlenoxyds auf die Gärung von Tetanus-
und Gasbrandbazillen**



Berlin

Verlag von Julius Springer

1935

Die

Biochemische Zeitschrift

erscheint zwanglos in Heften, die in kurzer Folge zur Ausgabe gelangen; je sechs Hefte bilden einen Band. Der Preis des Bandes beträgt RM 28.—.

In der Regel können Originalarbeiten nur Aufnahme finden, wenn sie nicht mehr als $1\frac{1}{2}$ Druckbogen umfassen. Sie werden mit dem Datum des Eingangs versehen und der Reihe nach veröffentlicht, sofern die Verfasser die Korrekturen rechtzeitig erledigen. — Kurze Mitteilungen wichtigen Inhalts können außerhalb der Reihenfolge des Einlaufdatums abgedruckt werden, wenn sie den Raum von 1—2 Druckseiten nicht überschreiten. — Abhandlungen polemischen Inhalts werden nur dann zugelassen, wenn sie eine tatsächliche Richtigstellung enthalten und höchstens zwei Druckseiten einnehmen.

Manuskriptsendungen sind an die Herausgeber:

Herrn Prof. Dr. C. Neuberg, Berlin-Dahlem, Hiltorfstraße 18, oder

Herrn Prof. Dr. W. Grassmann, Dresden 24, Wietlandstraße 2,

zu richten.

Bei Arbeiten aus Instituten, Kliniken usw. ist eine Erklärung des Direktors oder eines Abteilungsleiters beizufügen, daß er mit der Publikation der Arbeit aus dem Institut bzw. der Abteilung einverstanden ist und den Verfasser auf die Aufnahmebedingungen aufmerksam gemacht hat.

Die Autoren erhalten eine *Faktenkorrektur*. Revisionen können nur ausnahmsweise verabfolgt werden und verursachen oft eine Zurückstellung der Mitteilung. Auf Wunsch der in weit entfernten oder überselischen Ländern wohnenden Mitarbeiter wird die Korrektur ihrer Abhandlung hier gelesen, wodurch ein beschleunigtes Erscheinen ermöglicht wird.

Der Autor erhält einen Unkostenersatz von RM 20.— für den 16seitigen Druckbogen, jedoch im Höchstfalle RM 30.— für eine Arbeit.

Es wird ausdrücklich darauf aufmerksam gemacht, daß mit der Annahme des Manuskriptes und seiner Veröffentlichung durch den Verlag das ausschließliche Verlagsrecht für alle Sprachen und Länder an den Verlag übergeht, und zwar bis zum 31. Dezember desjenigen Kalenderjahres, das auf das Jahr des Erscheinens folgt. Hieraus ergibt sich, daß grundsätzlich nur Arbeiten angenommen werden können, die vorher weder im Inland noch im Ausland veröffentlicht worden sind, und die auch nachträglich nicht anderweitig zu veröffentlichen der Autor sich verpflichtet.

Die Mitarbeiter erhalten von ihren Arbeiten 40 Sonderdrucke unentgeltlich. Weitere 40 Exemplare werden, falls bei Rücksendung der 1. Korrektur bestellt, gegen eine angemessene Entschädigung geliefert. Darüber hinaus gewünschte Exemplare müssen zum gleichen Preise berechnet werden, den die Arbeit im Heft kostet, da die umfangreiche Versendung von Sonderdrucken den Absatz der Zeitschrift schädigt. Dissertations-exemplare werden von der Verlagsbuchhandlung grundsätzlich nicht geliefert.

Verlagsbuchhandlung Julius Springer

Berlin W 9, Linkstraße 23/24.

276. Band

Inhaltsverzeichnis

5.—6. Heft

| | Seite |
|--|-------|
| Aubel, E. und E. Simon. Über den Mechanismus der Milchsäurebildung im Muskel . . | 309 |
| Bodnár, J., Vitéz Ladislaus Nagy und Alexander Dickmann. Über die Nicotinaufnahme des Organismus beim Rauchen und das Schicksal des aufgenommenen Nicotins . . | 317 |
| Hermann, Stegwart und Nikolaus Fodor. C-Vitamin-(l-Ascorbinsäure)-Bildung durch eine Symbiose von Essigbakterien und Hefen | 323 |
| Eichholtz, F. und W. Kauderer. Ablagerung von Magnesiumverbindungen im Tumor | 326 |
| Szendró, P., E. Schleicher und L. Kluge. Wirkung von Röntgenstrahlen auf Kolloidzustand und Aminosäuregehalt von Rattensarkomen | 331 |
| Kuriyagawa, Taisuke, Hirowo Okawa, Kichiro Tajima, Tatsuo Hatakeyama und Shigehiro Katsura. Vergleichende Untersuchung des Fett- und Lipoidgehalts des Blutes in der rechten und linken Herzkammer | 336 |
| Tajima, Kichiro. Beitrag zur Kenntnis der alimentären Hyperlipämie | 343 |
| Tominaga, Kaoru. Beziehungen zwischen den Wirkungen des Tonsillenextraktes vom Menschen und des vegetativen Nervengiftes oder Hormons | 352 |
| Braunstein, A. E. und B. A. Severin. Über den Mechanismus der aeroben Resynthese der Adenylpyrophosphorsäure in Vogelerthrocyten | 359 |
| Blagowestschenski, A. W. und K. A. Nikolaeff. Über die Reversibilität der Wirkung des Histozyms | 368 |
| Péty, Josef. Ein einfacher Apparat zur Bestimmung des Gasstoffwechsels bei kleineren Tieren mit direkter Sauerstoffbestimmung | 376 |
| Dworzak, Rudolf und Wilhelm Prodingier. Über die optische Spaltung des racemischen Milchsäurealdehyds. (Vorläufige Mitteilung) | 383 |
| Stritar, M. J. Das biochemische Dreieck | 386 |
| Moraczewski, W. v. und T. Sadowski. Über die Verdrängung der Kationen in der gequollenen Gelatine. Einfluß des Cholesterins und des Lecithins auf die Quellbarkeit | 388 |

Fortsetzung des Inhaltsverzeichnisses siehe 3. Umschlagseite.

Wirkung des Kohlenoxyds auf die Gärung von Tetanus- und Gasbrandbazillen.

Von
C. Schlayer.

(Aus der II. Medizinischen Klinik der Charité in Berlin.)

(Eingegangen am 14. Februar 1935.)

Mit 1 Abbildung im Text.

Wie *W. Kempner*¹ in dieser Klinik gefunden hat, verlieren Buttersäurebakterien bei Gegenwart von Kohlenoxyd die Fähigkeit, Zucker in Buttersäure, Wasserstoff und Kohlensäure zu spalten. Wird das Kohlenoxyd wieder durch ein indifferentes Gas wie Argon oder Stickstoff ersetzt, so beginnt die Buttersäuregärung von neuem. Das Ferment der Buttersäuregärung reagiert also reversibel mit Kohlenoxyd, kann also nur eine Schwermetallverbindung sein; denn ausschließlich Schwermetalle besitzen die Eigenschaft, bei niedriger Temperatur mit Kohlenoxyd zu reagieren. Durch diese Entdeckung war zum ersten Male der Schwermetallcharakter eines Gärungsferments bewiesen.

Daß es sich bei diesem Schwermetall um Eisen handelt, wurde ebenfalls von *W. Kempner*², gemeinsam mit *F. Kubowitz*, gezeigt. Die Kohlenoxydverbindungen des Eisens unterscheiden sich von den Kohlenoxydverbindungen aller übrigen Schwermetalle dadurch, daß sie durch Licht gespalten werden, z. B. $\text{Fe}(\text{CO})_5 \rightarrow \text{Fe} + 5 \text{CO}$ oder Kohlenoxydhämoglobin in Kohlenoxyd und Hämoglobin. Das gleiche Phänomen der Dissoziation im Licht, hier der Trennung des CO-Moleküls vom Fermentmolekül, zeigt sich bei Belichtung der durch Kohlenoxyd gehemmten Buttersäurebakterien. Waren beispielsweise durch eine bestimmte Bakterienmenge 100 mg Buttersäure in 1 Stunde gebildet, so sank im Kohlenoxydmedium die Buttersäurebildung auf 5 mg in der Stunde; wurden die Bakterien im Kohlenoxydmedium bestrahlt (mit weißem Licht oder mit Licht einzelner Farben), so stieg die Gärung von 5 mg wieder auf 95 mg in der Stunde an. Auf diese Weise war es möglich, durch Belichtung oder Verdunkelung der Zellen Gärung entweder hervorzurufen oder zu verhindern; die Verbindung des Gärungsferments mit Kohlenoxyd löst sich in einem Kohlenoxydmedium unter der Wirkung des Lichtes in gleicher Weise, als wenn das Kohlenoxyd überhaupt entfernt und durch ein indifferentes Gas ersetzt wäre. Das Ferment, das die sauerstofflose Spaltung bei der Buttersäuregärung katalysiert, ist eine Eisenverbindung, diese Gärung der Buttersäurebakterien ist eine Eisenkatalyse.

Nachdem die Wirkung des Kohlenoxyds auf die Gärung der Buttersäurebakterien gefunden war, lag es nahe, auch bei anderen gärenden

¹ *W. Kempner*, diese Zeitschrift 257, 41, 1933. — ² *W. Kempner* u. *F. Kubowitz*, ebenda 265, 245, 1933.

Bakterien die Wirkung des Kohlenoxyds zu untersuchen, um so entscheiden zu können, ob es sich bei dem anaeroben Stoffwechsel anderer Bakterien ebenfalls um Schwermetallkatalysen handelt. Warburg¹ hatte bereits 1927 versucht, die Gärung von Hefezellen und Milchsäurebakterien durch Kohlenoxyd zu hemmen, doch konnte er eine Hemmung dieser Gärungen nicht einmal mit einem Kohlenoxyddruck von 60 Atmosphären erreichen, d. h. einem über tausendmal so starken Druck als er zur Hemmung der Buttersäuregärung erforderlich war. Es mag sein, daß die Anwendung noch höherer Kohlenoxydkonzentrationen auch hier zu einem Resultat führen würde; bisher hat diese Methode der Kohlenoxydhemmung bei Untersuchung der alkoholischen und Milchsäuregärung versagt, natürlich auch in dem Sinne, daß durch das Ausbleiben einer Reaktion zwischen Ferment und Kohlenoxyd nicht etwa bewiesen wäre, daß es sich bei diesem Ferment *nicht* um eine Schwermetallverbindung handelt. Hingegen konnte eine Wirkung des Kohlenoxyds gefunden werden auf die Spaltung von Ameisensäure in Wasserstoff und Kohlensäure bei *Bacterium coli*² und eine durch Licht aufzuhebende Wirkung des Kohlenoxyds auf die Spaltung von Brenztraubensäure in Essigsäure, Kohlensäure und Wasserstoff bei *Clostridium butyricum*³. Gemeinsam ist allen Gärungen, die durch Kohlenoxyd gehemmt werden, der Buttersäuregärung, Ameisensäurespaltung und Brenztraubensäurespaltung, daß es sich bei ihnen um Gärungen handelt, in denen Wasserstoff entsteht.

Uns interessiert von klinischen Gesichtspunkten aus besonders der Fermentmechanismus des Stoffwechsels der *pathogenen* Bakterien, also in diesem Zusammenhang der pathogenen Anaerobier, der „Giftbildner“, und nicht nur aus theoretischen Gründen: denn vielleicht führt hier ein Weg über die Aufklärung der Substanzen, die die Gärung katalysieren, zur chemischen Definition der Giftbildung. Ich habe stark toxische Stämme⁴ von Tetanus und Gasbrand untersucht. Die Giftbildung dieser Bakterien findet ausschließlich unter anaeroben Bedingungen statt, denn bei Sauerstoffgegenwart sterben sie rasch ab, wie im manometrischen Versuch von R. Lohmann gezeigt wurde⁵; die Giftbildung ist also an die sauerstofflosen Spaltungsreaktionen dieser Bakterien gebunden: damit werden die beispielsweise in Gasbrandbakterien wirkenden Gärungsfermente mittelbar oder unmittelbar Katalysatoren der

¹ O. Warburg, diese Zeitschr. 189, 354, 1927. — ² M. Stephenson u. L. H. Stickland, The Biochem. J. 26, 712, 1932. — ³ W. Kempner u. F. Kubowitz, diese Zeitschr. 265, 245, 1933, zitiert nach F. Kubowitz, ebenda 274, 297, 1934; siehe auch diese ausführliche Arbeit. — ⁴ Die Ausgangskulturen wurden mir liebenswürdigerweise von der bakteriologischen Abteilung des Reichsgesundheitsamtes, Berlin-Dahlem, zur Verfügung gestellt. — ⁵ R. Lohmann, Klin. Wochenschr. 1934, Nr. 31, S. 1116.

Bildung des Gasbrandgiftes. Die vorliegende Mitteilung berichtet von der Wirkung des Kohlenoxyds auf die anaerobe Gärung von Tetanus- und Gasbrandbakterien, manometrisch an der Gasbildung (Kohlensäure- und Wasserstoffbildung) dieser Bakterien unter Sauerstoffabschluß gemessen.

Es ergab sich:

I. Die Kohlensäure- und Wasserstoffbildung dieser Bakterienarten wird bereits durch geringe Kohlenoxydkonzentrationen von 3 bis 10 % CO in Stickstoff um 85 % gehemmt und beginnt wieder mit unverminderter Stärke, wenn das Kohlenoxyd/Stickstoffgemisch durch reinen Stickstoff ersetzt ist (ein Protokoll als Beispiel). Das in Tetanus- und Gasbrandbakterien wirksame Gärungsferment bildet also eine reversible Verbindung mit Kohlenoxyd, d. h. mit einem Gas, das bei dieser Temperatur ausschließlich mit Schwermetallen reagiert. Das Ferment, das

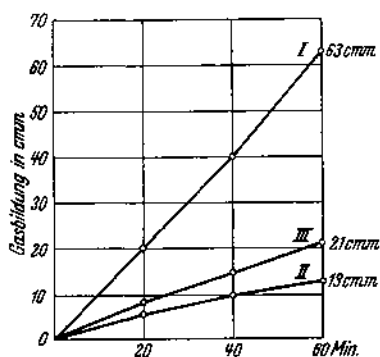


Abb. 1. Gasbrandbakterien, bei 30° C in phosphathaltiger Bouillon anaerob gezüchtet, nach 24stündigem Wachstum in Manometergefäße pipettiert. Gasbildung (Wasserstoff und Kohlensäure) in Stickstoff, Kohlenoxyd/Stickstoffgemisch im Dunkeln und Kohlenoxyd/Stickstoffgemisch bei Belichtung gemessen. Trockengewicht der in 1 cm suspendierten Bakterienmenge: 5,8 mg. Versuchstemperatur: 10° C.

I N₂,
II 5% CO dunkel,
III 5% CO belichtet.

den mit einer Gasbildung verbundenen anaeroben Stoffwechsel dieser giftbildenden Bakterien katalysiert, ist also eine Schwermetallverbindung.

II. Diese Kohlenoxydhemmung der anaeroben Gärung der Tetanus- und Gasbrandbakterien ist empfindlich gegen sichtbares Licht, d. h. die Gärung im Kohlenoxydmedium steigt an bei Belichtung und nimmt wieder ab bei Verdunkelung, so daß es möglich ist, durch Verdunkelung und Belichtung Gärung zu hemmen oder zu steigern. Die Lichtintensität, die notwendig ist, um die Gärungshemmung durch Kohlenoxyd vollständig aufzuheben, ist -- wie bei Buttersäurebakterien -- beträchtlich (Bogenlampe oder Hg-Lampe), doch ist ein gut meßbarer Effekt bereits mit einer einfachen 150-Kerzen-Metallfadenlampe, 4 cm vom Boden des Versuchsgefäßes entfernt, zu erreichen (siehe Kurve). Die Kohlenoxydverbindungen lediglich des Eisens besitzen die Eigenschaft, im Licht zu dissoziieren, die Kohlenoxydverbindung des Gärungsferments der

untersuchten Bakterien wird in gleicher Weise durch Licht reversibel gespalten: Tetanus- und Gasbrandbakterien besitzen also eisenhaltige Gärungsfermente, die anaeroben mit einer Gasbildung verbundenen Stoffwechselreaktionen dieser Bakterien sind Eisenkatalysen.

Protokoll.

Gasbrandbakterien, bei 30° C in phosphathaltiger Bouillon (p_H : 6,9) anaerob gezüchtet, nach 24stündigem Wachstum in Manometergefäße pipettiert. Gasbildung (Kohlensäure und Wasserstoff) in sauerstoffreiem Stickstoff und Kohlenoxyd/Stickstoffgemisch gemessen. Trockengewicht der in 1 ccm suspendierten Bakterienmenge: 1,6 mg. Versuchstemperatur: 30° C.

| | | | | |
|------------------------------|---|--|---------------|--|
| Volumina in ccm | { | $v_f = 1$ | $v_f = 1$ | |
| | | $v_g = 11,75$ | $v_g = 11,70$ | |
| Gefäßkonstanten in qmm . . . | | 1,094 | 1,088 | |
| Gasraum | | 100 ⁰ / ₁₀ N ₂ | | 5 ⁰ / ₁₀ CO/95 ⁰ / ₁₀ N ₂ |
| Gasbildung | | mm Brodie | emm | mm Brodie |
| Nach 10 Min. | | 9 | 9,8 | 2,5 |
| " 20 " | | 18 | 19,7 | 5,5 |
| " 30 " | | 27 | 29,5 | 8,5 |
| Gasraum | | 5 ⁰ / ₁₀ CO/95 ⁰ / ₁₀ N ₂ | | 100 ⁰ / ₁₀ N ₂ |
| Gasbildung | | mm Brodie | emm | mm Brodie |
| Nach 10 Min. | | 3 | 3,3 | 8 |
| " 20 " | | 5,5 | 6,0 | 17 |
| " 30 " | | 8 | 8,8 | 25,5 |

Das Protokoll zeigt: Hemmung der Gasbildung durch 5% CO um $\frac{29,5 - 9,2}{29,5} = 69\%$. Nach Entfernung des CO stieg die Gasbildung auf den Anfangswert der Stickstoffkontrolle, die CO-Hemmung ist also reversibel.

The Metabolism of Human Erythroblasts

Reprinted from THE JOURNAL OF CLINICAL INVESTIGATION, Vol. XV, No. 6, November, 1936.
Printed in U. S. A.

THE METABOLISM OF HUMAN ERYTHROBLASTS

By WALTER KEMPNER

(From the Department of Medicine, Duke University School of Medicine, Durham)

(Received for publication June 29, 1936)

The metabolism of human nucleated red blood cells has not previously been determined because of difficulties in procuring material. In most anemias the number of nucleated erythrocytes in the blood is so small in relation to the number of non-nucleated erythrocytes that the metabolism of the former is obscured by that of the latter. Moreover, it is impossible without damaging their very sensitive metabolic reactions to separate in sufficient amount the nucleated from the non-nucleated red blood cells and from the leukocytes.

The opportunity recently presented itself through the kindness of the Department of Pediatrics of examining at intervals of from three to five months the blood of a patient with erythroblastic anemia who had an extremely high proportion of nucleated red blood cells, 130,000 to 364,000 erythroblasts to 1.8 to 3.5 million non-nucleated erythrocytes in 1 c.mm. of blood. The patient was an eight year old boy of Greek parentage. One sister died at 2 years with symptoms similar to the patient's. Parents and a 3 year old brother are in good health. Since 1932 the patient has been given blood transfusions for his anemia regularly every few months. Splenectomy in 1933 was not followed by any evident improvement. At the time this study was begun there were 245,000 erythroblasts and 3.25 million non-nucleated red blood cells in 1 c.mm., that is, a percentage of 7 per cent of erythroblasts in his total red cell count. The percentage of reticulocytes was below 1 per cent. The leukocytes varied between 5,000 and 7,000 per c.mm.

METHOD

To determine the exact metabolism of animal cells in vitro it is imperative to avoid injury and changes in the physiological environment by physical and chemical factors. Allowing the blood to stand (anaerobiosis), cooling, centrifuging, washing with salt solutions, dilution, substitutions for the normal plasma constituents, changes in pH, in O_2 and CO_2 tension, etc., must

be avoided. The error due to neglect of these precautions does not merely consist in the fact that the absolute metabolic values obtained are incorrect; respiration is also qualitatively changed, as for example, in its effect upon lactic acid fermentation or in the way it is influenced by HCN or CO. In dealing with sensitive cells, therefore, the metabolism must be measured in the unchanged blood, plasma, exudate, etc., though this makes the experiment more difficult, and as soon as possible after the cells are taken from the body.

The erythroblastic blood was taken in heparin (5 mgm. in 20 cc.) from the cubital vein, immediately saturated at $37.5^\circ C$. with a mixture of 5 per cent CO_2 and 20 per cent O_2 , shaken gently with glass beads for five minutes and filtered through gauze. Then, avoiding cooling of the blood, 6 cc., 3 cc. and 3 cc. respectively were pipetted into three Warburg manometer vessels (plain rectangular vessels with side bulbs of 17 cc. capacity) (1). The side bulbs of the vessels contained 0.2 cc. of an M/40 solution of lactic acid, the exact concentration of which was determined manometrically. While shaking at 150 oscillations per minute, the vessels in the thermostat were again saturated at 37.5° with a mixture of 5 per cent CO_2 and 20 per cent O_2 . Then the determination was begun in the aerobic manometer vessels 1 and 2. To obtain entirely anaerobic conditions vessel 3, containing 3 cc. of blood, was saturated for ten minutes with 2 liters of a mixture of 5 per cent CO_2 in CO (2), since in erythrocytes a saturation with 5 per cent CO_2 in nitrogen is not sufficient to produce complete anaerobiosis, because of the great amount of oxygen in combination with the hemoglobin. After the experiment the retention of lactic acid was determined (3) by tipping the 0.2 cc. lactic acid solution containing 112 c.mm. = 0.45 mgm. lactic acid, from the side bulb of the vessel into the blood. The retention of carbon dioxide was determined in a special vessel which contained 2 cc. of blood in the central space and 2 cc. of bicar-

bonate-Ringer solution in the outer space, by tipping the same amount of lactic acid into the bicarbonate-Ringer solution.

The metabolism, that is, O_2 consumption, CO_2 formation, aerobic and anaerobic lactic acid formation (glycolysis) was calculated according to the Warburg formulae (1). The dry weight was determined by Peschel's (4) method after centrifuging in special centrifuge tubes appropriate volumes of blood and drying at $100^\circ C$.

RESULTS

Table I shows the metabolism of the blood of a normal six year old child and of the blood of the patient with erythroblastic anemia. Calculated per milligram of dry weight of cells, the respiration of the erythroblastic blood is 19 times as great, the anaerobic glycolysis 7 times as great and the rate of aerobic glycolysis about 4 times as great as in normal blood. The ratio of aerobic glycolysis to respiration is 2.3 in erythroblastic blood and 10 in normal blood. This means that not only are the absolute metabolic values of respiration and glycolysis considerably greater, but through the greater increase in respiration the ratio of splitting metabolism to respiration metabolism in the erythroblasts has shifted decidedly in favor of the respiration metabolism.

TABLE I

Metabolism of erythroblastic blood and of normal blood

| | I Q_{O_2} c.mm. oxygen consumed in 1 hour | II Q_{O_2} c.mm. lactic acid formed under aerobic conditions in 1 hour* | III Q_{CO_2} c.mm. lactic acid formed under anaerobic conditions in 1 hour* | IV Inhibition of lactic acid formation by oxygen | V Aerobic lactic acid formation: respiration $\frac{II}{I}$ |
|---|---|---|---|---|---|
| By 1 mgm. blood cells of the patient with erythroblastic anemia | 0.94 | 2.17 | 4.08 | per cent 47 | 2.3 |
| By 1 mgm. blood cells of a normal 6 year old child | 0.05 | 0.5 | 0.58 | 13.8 | 10 |

* 1 c.mm. = 0.004 mgm. lactic acid.

From the ratio of the metabolism figures of erythroblastic blood to those of normal blood, with the same number of leukocytes and thrombocytes one can obtain an approximate estimate

of the metabolism of the erythroblasts themselves as distinguished from the metabolism of normal red blood cells (Table II). It must be remembered, however, that blood containing numerous young non-nucleated erythrocytes has a greater respiration rate than normal blood, as Warburg (5) demonstrated in the blood of young rabbits and Morawitz et al. (6, 7) in the blood of anemic patients with marked blood regeneration.

TABLE II

Calculation of the metabolism figures for 1 mgm. erythroblasts

| | I Q_{O_2} c.mm. oxygen consumed in 1 hour | II Q_{O_2} c.mm. lactic acid formed under aerobic conditions in 1 hour* | III Q_{CO_2} c.mm. lactic acid formed under anaerobic conditions in 1 hour* | IV Inhibition of lactic acid formation by oxygen | V Aerobic lactic acid formation: respiration $\frac{II}{I}$ |
|--|---|---|---|---|---|
| 1 mgm. blood cells of patient with erythroblastic anemia (7 per cent nucleated red cells and 93 per cent normal blood cells) minus | 0.940 | 2.17 | 4.08 | per cent 47 | 2.3 |
| 0.93 mgm. normal blood cells (93 per cent of the cells of erythroblastic blood) | 0.047 | 0.47 | 0.54 | 13.8 | 10 |
| 0.07 mgm. erythroblasts (7 per cent of the cells of erythroblastic blood) | 0.893 | 1.70 | 3.54 | | |
| 1 mgm. erythroblasts | 12.8 | 24.3 | 50.6 | 52 | 1.9 |

* 1 c.mm. = 0.004 mgm. lactic acid.

Damblé (8) repeated the experiments of Morawitz with the newer Warburg methods, determining quantitatively the oxygen consumption of anemic blood in different forms of anemia and comparing it with the number of reticulocytes. In pernicious anemia and in secondary anemias with a non-reactive bone marrow he found the respiration of the erythrocytes less than in normal blood, whereas in secondary anemias with reactive bone marrow and high reticulocyte count the respiration was markedly increased. The highest value, an oxygen consumption for erythrocytes two and a half times that of normal blood, he found in a case of posthemorrhagic anemia in a young patient in the stage of blood regeneration, with a reticulocyte count of 10.2 per cent (erythrocytes 2.5 million, hemoglobin 51 per cent).

METABOLISM OF ERYTHROBLASTS

681

With a decreasing content of reticulocytes the respiration returned to normal.

The anaerobic glycolysis of the erythrocytes of anemic patients was quantitatively determined for the first time by W. Burger (2). He found the anaerobic lactic acid formation increased in about 45 per cent of his anemic patients compared with that of the erythrocytes of normal people. In one patient with pernicious anemia he found the anaerobic blood glycolysis increased four times. Unfortunately, counts for reticulocytes and for nucleated red blood cells are not given so that no relationship can be established between the number of nucleated red blood cells and reticulocytes and the glycolytic activity of the blood.

Since our patient, in contrast to most of the cases of erythroblastic anemia described in the literature (9, 10), showed no increase of reticulocytes in the blood, the reticulocyte count at the time of the experiment being below 1 per cent, we have no reason to use the metabolism figures of anemic blood for the metabolism of his non-nucleated blood corpuscles, but the calculations must be based on the metabolism figures of normal non-nucleated blood cells. The respiration of erythroblasts, however, is of such a different order of magnitude compared to the respiration of non-nucleated red blood cells, including those of regenerative anemic blood, that even if one used for basic figures twice the highest respiration rate found in anemias, with a large number of reticulocytes, the respiration value of the erythroblasts would not be appreciably decreased.

Table II shows the calculation of the metabolism figures for 0.07 mgm. of erythroblasts. In 1 mgm. of erythroblasts an oxygen consumption of 12.8 c.mm. per hour results, aerobic glycolysis of 24.3 c.mm. (=0.098 mgm. lactic acid) and anaerobic glycolysis of 50.6 c.mm. (=0.203 mgm. lactic acid). The ratio of respiration to aerobic glycolysis, which is 1:10 in normal blood, is here 1:1.9. If one applies the highest respiration rates found by Damblé in severe anemias with 10 per cent of the reticulocytes, instead of the respiration rates of normal non-nucleated blood cells and, as stated before, there is no reason to do this in the case of our patient since he has a normal reticulocyte count, one would find

a QO_2 of 11.5 for the respiration of erythroblasts instead of a QO_2 of 12.8. If one applies five times the respiration rate of normal blood cells which is twice the highest figure found in anemic blood, the respiration rate of erythroblasts would only be changed from 12.8 to 10.1.

The metabolism rates of human erythroblasts as compared with those of human leukocytes (4, 11) and of the nucleated red blood corpuscles of geese and alligators, which we examined by the same method at 37.5° C. in their own plasma are given in Table III. Similar values for the metabolism of blood cells of geese in bicarbonate-Ringer solution and for the oxygen consumption of alligator blood cells were found by Negelein

TABLE III
Metabolism of nucleated blood cells

| Cell species | I QO_2 c.mm. oxygen con- sumed in 1 hour | II QO_2 c.mm. lactic acid formed under aerobic condi- tions in 1 hour* | III QCO_2 c.mm. lactic acid formed under anae- robic condi- tions in 1 hour* | IV Inhibi- tion of lactic acid forma- tion by oxygen | V Aerobic lactic acid forma- tion: respira- tion $\frac{II}{I}$ |
|---|---|---|---|---|---|
| | | | | per cent | |
| Human erythroblasts... | 12.8 | 24.3 | 50.6 | 52 | 1.92 |
| Human exudate leuko- cytes (11)..... | 22.8 | 16.8 | 57.8 | 71 | 0.74 |
| Human leukemic lympho- cytes (4)..... | 5.8 | 0 | 11.1 | 100 | 0 |
| Red blood cells of nor- mal geese..... | 0.54 | 0 | 0.51 | 100 | 0 |
| Red blood cells of ane- mic geese..... | 1.06 | 0.16 | 1.9 | 92 | 0.15 |
| Red blood cells of alli- gators..... | 0.28 | 0.11 | 0.65 | 83 | 0.39 |

* 1 c.mm. = 0.004 mgm. lactic acid.

(12) and Tipton (13). The respiration of human erythroblasts is seen to be 45 times greater than the respiration of the nucleated red blood corpuscles of alligators; about 24 times greater than the respiration of red blood cells of normal geese and about 12 times greater than the respiration of the erythroblasts of anemic geese. The metabolism of leukemic lymphocytes is considerably less than that of the erythroblastic cells. The ratio of aerobic glycolysis to respiration is in human erythroblasts 1.92, in human exudate leukocytes 0.74, in human leukemic leukocytes 0. The anaerobic glycolysis of human erythroblasts is 26 to 100 times greater than that of the nucleated red blood cells of geese and alligators and nearly

as great as the anaerobic glycolysis of leukocytes in inflammatory exudates.

In Table IV is given a comparison of the metabolism of erythroblasts with the metabolism of animal tissue cells. Human erythroblasts are among the cells with the highest anaerobic glycolysis, being of about the same order of magnitude as the glycolysis of embryonic tissue.

TABLE IV
Metabolism figures for human and animal tissue cells

| Cell species | I O ₂ c.mm. oxygen consumed in 1 hour | II O ₂ N ₂ or CO c.mm. lactic acid formed under anaerobic conditions in 1 hour * |
|---|--|--|
| | | |
| Human erythroblasts..... | 12.8 | 50.6 |
| Smooth muscle of human stomach (14)..... | 1.3 | 2.3 |
| Adrenals of guinea pig (15)..... | 6 | 3 |
| Human liver (embryo 4th month) (16)..... | 6.3 | 9.7 |
| Human kidney (cortex) (16) (17)..... | 10 | 10.8 |
| Human malignant tumor (1)..... | 5 | 28 |
| Spermatozoa of steer (18)..... | 9 | 28 |
| Rat embryo (0.9 to 3.1 mgm.) (19) | 12 | 25 |
| Embryonic chicken heart (4 days old) (20)..... | 30 | 52 |
| Rat retina (21) (22)..... | 31 | 88 |

* 1 c.mm. = 0.004 mgm. lactic acid.

SUMMARY

The metabolism of human nucleated red blood cells has been measured manometrically in the blood of a patient with erythroblastic anemia. The erythroblasts show very high oxidative and fermentative metabolism. The respiration is approximately 200 times greater than that of normal non-nucleated human red blood cells (12.8:0.05), 100 times greater than the respiration of blood cells of anemic patients with a great number of reticulocytes (12.8:0.12), and about 20 times greater than that of the nucleated red blood cells of geese (12.8:0.54). In erythroblasts, as in human inflammatory exudates, in leukocytes and in non-nucleated red blood cells, respiration is not sufficient to cause the lactic acid formed to disappear, but the ratio of respiration metabolism to glycolytic metabolism as compared to that of non-nucleated red blood cells, is shifted decidedly in

favor of the respiration metabolism (1:1.9 as against 1:10).

The anaerobic lactic acid formation of erythroblasts is about 90 to 100 times greater than that of normal human blood cells and of normal erythrocytes of geese (50.6:0.58 and 0.51), and 25 times greater than that of erythrocytes of geese with marked anemia. The anaerobic lactic acid formation is of the same order of magnitude as that found in youngest embryonic tissue.

BIBLIOGRAPHY

1. Warburg, O., Über den Stoffwechsel der Tumoren. J. Springer, Berlin, 1926.
2. Burger, W., Über Glykolyse der roten Blutkörperchen. Arch. f. exper. Path. u. Pharmacol., 1930, 150, 298.
3. Warburg, O., Kubowitz, F., and Christian, W., Über die Wirkung von Phenylhydrazin und Phenylhydroxylamin auf den Stoffwechsel der roten Blutzellen. Biochem. Ztschr., 1931, 242, 170.
4. Peschel, E., Stoffwechsel leukämischer Lymphocyten. Klin. Wchnschr., 1930, 9, 1061.
5. Warburg, O., Zur Biologie der roten Blutzellen. Ztschr. f. physiol. Chem., 1909, 59, 112.
6. Masing, E., and Morawitz, P., Höhenklima und Blutbildung. Deutsches Arch. f. klin. Med., 1910, 98, 301.
7. Morawitz, P., and Itami, S., Klinische Untersuchungen über Blutregeneration. Deutsches Arch. f. klin. Med., 1910, 100, 191.
8. Dambélé, K., Über die Atmung der roten Blutkörperchen bei Anämie. Ztschr. f. d. ges. exper. Med., 1933, 86, 595.
9. Baty, J. M., Blackfan, K. D., and Diamond, L. K., Blood studies in infants and in children. I. Erythroblastic anemia. A clinical and pathologic study. Am. J. Dis. Child., 1932, 43, 666.
10. Cooley, T. B., and Lee, P., Erythroblastic anemia; additional comments. Am. J. Dis. Child., 1932, 43, 705.
11. Kempner, W., and Peschel, E., Stoffwechsel der Entzündung. Ztschr. f. klin. Med., 1930, 114, 439.
12. Negelein, E., Versuche über Glykolyse. Biochem. Ztschr., 1925, 158, 121.
13. Tipton, S. R., Factors affecting the respiration of vertebrate red blood cells. J. Cell. and Comp. Physiol., 1933, 3, 313.
14. Rosenthal, O., and Lasnitzki, A., Über den Stoffwechsel stationärer und wachsender Gewebe. Biochem. Ztschr., 1928, 196, 340.
15. Fujita, A., Über den Stoffwechsel der Körperzellen. Biochem. Ztschr., 1928, 197, 175.
16. Krebs, H. A., Grösse der Atmung und Gärung in lebenden Zellen. Handbuch d. Biochem., 1933, Erg. 1B., 866.

METABOLISM OF ERYTHROBLASTS

683

17. György, P., Keller, W., and Brehme, Th., Nierenstoffwechsel und Nierenentwicklung. *Biochem. Ztschr.*, 1928, 200, 356.
18. Redenz, E., Über den Spaltungsstoffwechsel der Säugetierspermatozoen im Zusammenhang mit der Beweglichkeit. *Biochem. Ztschr.*, 1933, 257, 234.
19. Negelein, E., Über die glykolytische Wirkung des embryonalen Gewebes. *Biochem. Ztschr.*, 1925, 165, 122.
20. Warburg, O., and Kubowitz, F., Stoffwechsel wachsender Zellen (Fibroblasten, Herz, Chorion). *Biochem. Ztschr.*, 1927, 189, 242.
21. Warburg, O., Posener, K., and Negelein, E., Über den Stoffwechsel der Carcinomzelle. *Biochem. Ztschr.*, 1924, 152, 309.
22. Sella, C., Weinstein, P., and Jány, J., Weitere Studien über den Stoffwechsel der Zelle. *Biochem. Ztschr.*, 1932, 247, 146.

***Chemical Nature of the Oxygen-Transferring
Ferment of Respiration in Plants***

Reprinted from PLANT PHYSIOLOGY, 11: 605-613, 1936.

CHEMICAL NATURE OF THE OXYGEN-TRANSFERRING FERMENT OF RESPIRATION IN PLANTS

WALTER KEMPNER

(WITH THREE FIGURES)

Introduction

CHEMICAL NATURE OF OXIDATION FERMENTS IN ANIMAL CELLS AND BACTERIA

The effect of carbon monoxide on the respiration of animal cells and aerobic bacteria (10), and on anaerobic butyric acid fermentation (6), has shown that the ferments which act as catalysts in these energy-yielding cellular processes are compounds of heavy metals: for carbon monoxide reacts at low temperatures only with heavy metals, and respiration as well as anaerobic butyric acid fermentation is stopped at low temperatures by carbon monoxide (6, 10). It has been further shown that these catalysts of respiration and of the anaerobic butyric acid fermentation are compounds of iron: for, of all the combinations of carbon monoxide with heavy metals only those with iron are dissociated by visible light, and the cell which in the presence of carbon monoxide stops respiring or forming butyric acid, recommences its metabolic reactions when irradiated by light (7, 10, 11).

Two iron ferments, the oxygen-transferring ferment of respiration and the anaerobic-splitting ferment, are apparently in too small a concentration and are too unstable to be isolated from the living cells by the usual methods of analytical chemistry. By combining them with carbon monoxide and by measuring the various degrees of dissociation of the ferment-CO combinations (by the increase of the respiration or of the anaerobic-splitting metabolism when irradiated by different wave lengths of visible light) an indirect method was found for examining the ferments and determining their absorption spectra, their "color," within the structure of the living cell, as it were, without separating them chemically from the other cellular substances. After the absorption spectrum of the ferment-CO combination had once been found, it was possible to compare it with the absorption spectra of substances which are accessible and can be analyzed by the ordinary methods of chemistry. In this way WARBURG (12) discovered that the constitution of the oxygen-transferring ferment of respiration in animal body cells and aerobic bacteria was phaeohaemin.

Neither alcohol fermentation nor lactic acid fermentation can be affected by carbon monoxide (11), and according to WARBURG and CHRISTIAN (13) "there are also oxidation processes which are insensitive to carbon monoxide as in *Chlorella*, yeast press juice and anaerobic bacteria." From these anaerobic bacteria it was possible to separate a catalytically active substance,

an iron-free oxidation ferment, the so-called yellow ferment of WARBURG (13, 14). So, at present we know the chemical constitution of two respiration ferments: the oxygen-transferring ferment, phaeohaemin, in animal cells and aerobic bacteria; and an oxygen-transferring ferment, the yellow ferment, in anaerobic bacteria.

PREVIOUS DATA ON EFFECT OF CARBON MONOXIDE UPON RESPIRATION OF PLANT CELLS

The influence of carbon monoxide upon the respiration of plant cells was studied by EMERSON (3), and PADOA and VITA (8). EMERSON's experimental material was the alga *Chlorella*. As the result of his investigations EMERSON states that carbon monoxide has no effect upon the respiration of plants, which are autotrophic (i.e., which obtain their energy by the "self-nourishment" of photosynthesis). Only after he succeeded in changing this original metabolism of plants into a heterotrophic metabolism, that is to say into a "parasitic" metabolism, by suspending the cells in a special sugar-containing nutrient medium, did the alga become sensitive to carbon monoxide. Under these conditions EMERSON found, in spite of a rather low partial pressure of oxygen and a high partial pressure of carbon monoxide (2.5 per cent. O_2 , 97.5 per cent. CO ; ratio $CO/O_2 = 39$), only a small inhibition of respiration (15 to 25 per cent.). The experimental material of PADOA and VITA (8) was *Plantago major*, *Lemna minor*, and *Elodea canadensis*. These authors report that the respiration of plants is not inhibited by CO , but that, on the contrary, CO increases their respiration.

Experimentation

The experiments discussed in this paper endeavor to answer the following questions: What is the chemical nature of the oxygen-transferring ferment of respiration in plants? Can this ferment be identified with one of the two oxidation ferments already known: the iron-free yellow ferment which is insensitive to carbon monoxide, or phaeohaemin which is sensitive to carbon monoxide? The writer has determined the effect of carbon monoxide on the respiration of the stamens of plums, stamens and pistils of daffodils, Spanish moss, green pine needles, and green leaves of tobacco, plum, and oleander plants. In all these plant cells the writer found that CO produces a strong reversible inhibition of respiration. For instance, in an atmosphere of 92 per cent. CO and 8 per cent. O_2 ($p_{CO}/p_{O_2} = 11.5$) compared with an atmosphere of 92 per cent. N_2 and 8 per cent. O_2 , the respiration of pine needles at a temperature of $20^\circ C$. is inhibited 70 per cent. This shows that the oxygen-transferring ferment of respiration in plants reacts with CO and must therefore be a compound of a heavy metal.

The inhibition of respiration by CO is reversible in visible light. By alternately illuminating plant cells and placing them in the dark in an atmosphere of O₂ and CO, respiration can be started or stopped. The ferment-CO compound dissociates in the light. This indicates that the oxygen-transferring ferment in plants is a colored substance and that it is a compound of iron.

The absorption of light by the respiration ferment-CO compound is of the same magnitude in plant cells as in liver cells and yeast. The rate of respiration of plum leaves, for example, in an atmosphere of CO/O₂ = 12, in the dark amounts to only 30 per cent. of the respiration in the CO/O₂ atmosphere when the leaves are illuminated by an ordinary 300-watt electric bulb placed 5 cm. below the bottom of the test vessel.

These findings indicate that the oxygen-transferring ferment of respiration in plant cells is identical with the oxygen-transferring phaeohaemin ferment of respiration in animal cells and aerobic bacteria. In white leaves (white ivy, *Zebrina pendula*, and sections of *Coleus*), petals, and roots, carbon monoxide did not have an effect of the same magnitude upon respiration.

EFFECT OF CARBON MONOXIDE ON RESPIRATION IN THE DARK

Two to 10 young green tobacco leaves (dry weight 24 to 120 mg.), or 10 to 50 young green pine needles (dry weight 40 to 200 mg.) and similar amounts of plum leaves, Spanish moss, and oleander leaves were put into a conical manometer vessel. Into the insert well of the manometer was poured 0.2 cc. H₂O to supply the requisite humidity, and into the side arm 0.2 cc. of 8 per cent. KOH to absorb the carbon dioxide formed in respiration. The vessels were wrapped in tin foil to exclude light. Gas mixtures of oxygen and carbon monoxide, oxygen and argon, or oxygen and nitrogen were prepared over mercury in a 2-liter gasometer, and the manometer vessels were saturated with these gases. The oxygen consumption was measured at temperatures between 0° and 32° C. in the Warburg apparatus.

Figure 1 shows the respiration of tobacco leaves in the O₂ and N₂ gas mixtures and at various O₂ and CO concentrations; and figure 2 shows the rate of inhibition of respiration in pine needles at various CO/O₂ ratios. Even at a ratio pCO/pO₂ = 4 the respiration is inhibited by 38 per cent. At a ratio of pCO/pO₂ = 20 the inhibition amounts to 77 per cent. If oxygen-argon or oxygen-nitrogen mixtures are substituted for oxygen-carbon monoxide, the respiration rate again becomes the same as that of the control. The inhibition of respiration by CO is therefore totally reversible.

The effect of CO on respiration proved to be independent of temperature in tobacco leaves, pine needles, Spanish moss, and stamens of plums and daffodils. In pistils of daffodils (at pCO/pO₂ = 20) the rate of inhibition increased with increasing temperature (at 14° C. 16 per cent.; at 20° C., 38

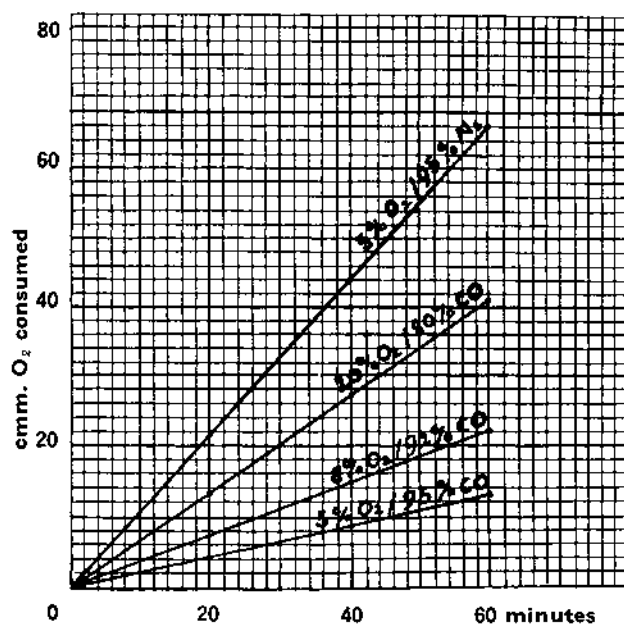


FIG. 1. Respiration of tobacco leaves (16 mg.) at various partial pressures of oxygen and carbon monoxide at 32° C.

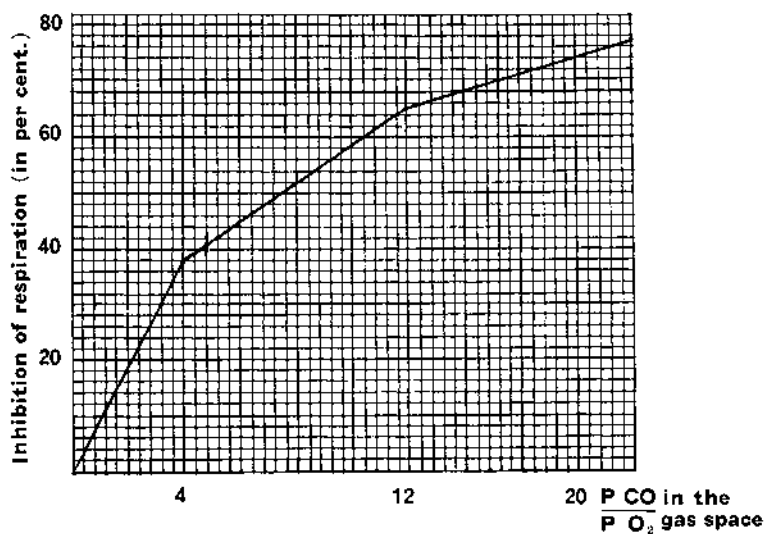


FIG. 2. Inhibitory effect of CO on respiration of pine needles at different ratios of CO/O₂ at 20° C.

KEMPNER: NATURE OF OXYGEN-TRANSFERRING FERMENT

609

per cent.; at 26° C., 53 per cent.) This dependence of CO inhibition on temperature is probably not due to a greater reactivity between the respiration ferment and CO, but rather to a different degree of saturation of the ferment at different temperatures under the experimental conditions.

EFFECT OF CARBON MONOXIDE ON RESPIRATION IN LIGHT

The difficulty in measuring the effect of light on the CO inhibition of respiration in plants is obvious, because as soon as the green plant cells are irradiated by visible light photosynthesis begins. Even if no free carbon dioxide is available, as in the presence of KOH, the green cells form oxygen in the presence of light. This difficulty can be avoided by slightly narcotizing the green cells. As BERNARD (1), and BONNIER and MANGIN (2) found, small concentrations of chloroform stop the assimilation without decreasing the rate of respiration. Accordingly, 0.1-0.2 cc. of a 5 per cent. chloroform solution in alcohol was added to the test vessels containing green leaves of the higher plants or pine needles. The time required for complete narcosis of the assimilation depends upon temperature and the variety of plant cells. For instance, 4 to 6 hours, at temperatures of from 10° to 15° C., are necessary to obtain constant gas pressures with pine needles. After this

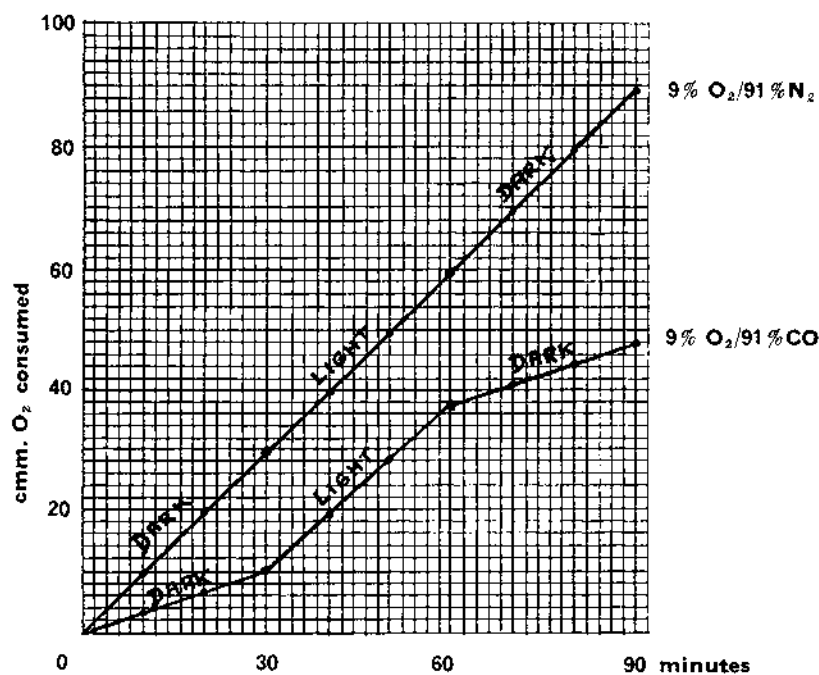


FIG. 3. Reversibility of carbon monoxide inhibition of respiration of 120 mg. of pine needles in light at 10° C.

period, photosynthesis has ceased and the effect of light upon the CO inhibition of respiration can easily be measured. As source of light, a 300-watt electric bulb was placed 5 cm. below the bottom of the manometer vessel. The vessel was shaken in the thermostat at a temperature of 10° C. Figure 3 gives the result of an experiment which shows the effect of light upon the CO inhibition of the respiration of 120 mg. of pine needles in which assimilation was eliminated by chloroform. While the inhibition of respiration in the dark at a ratio of $p\text{CO}/p\text{O}_2 = 10$ was 67 per cent., the inhibition in the light was only 8.3 per cent. The combination of the respiration ferment with carbon monoxide can be entirely dissociated by visible light.

EFFECT OF CARBON MONOXIDE UPON RESPIRATION OF TOBACCO LEAVES WITH MOSAIC DISEASE

The effect of carbon monoxide on tobacco plants infected with mosaic disease has been studied in order to determine whether this virus disease changes the respiratory mechanism of the cells. Small young leaves and sections of leaves showing the spots of the mosaic disease were examined at various CO/O_2 ratios. Unless the cells had reached the stage of necrosis, no change was found in the rate of respiration, in the sensitivity of the respiration to CO, and in the sensitivity of the ferment-CO combination toward light.

EFFECT OF CARBON MONOXIDE ON PLANT FERMENTATION

In the absence of free oxygen various plants can be kept alive for a limited time and photosynthesis may occur (15). The writer has measured the CO_2 formation of pine needles in the absence of free oxygen at various temperatures to determine whether this anaerobic metabolism in plants is inhibited by CO, as is the case in some anaerobic bacteria (6, 9) and in the photosynthetic *Thiorhodaceae* (4, 5). Thirty to 100 mg. of pine needles were put into manometer vessels which were saturated with mixtures of argon and carbon monoxide, argon and carbon dioxide, or carbon monoxide and carbon dioxide. To measure the CO_2 consumed in photosynthesis the oxygen was absorbed by white phosphorus in the side arm.

The pine needles can survive the lack of free oxygen at temperatures between 10° and 20° C. for from 4 to 6 hours without losing the capacity to assimilate CO_2 when exposed to light. If, within this time, they were brought back to aerobic conditions, the rate of respiration was not diminished. The CO_2 formed in the anaerobic-splitting metabolism is about 80 per cent. of the CO_2 formed by respiration. Formation of hydrogen in comparable quantities was not found under these conditions. The anaerobic CO_2 formation is not influenced by CO.

Since CO inhibits the respiration but not the anaerobic fermentation in plant cells, it is possible even under aerobic conditions to produce or inhibit

fermentation by adding or removing CO. Table I shows the effect of CO on the oxidative and on the splitting metabolism of 85 mg. of pine needles at 20° C. The O₂ absorbed and CO₂ released is measured in the presence and the absence of KOH in O₂ and N₂, O₂ and CO, N₂ and CO. The retention of CO₂ by the plant cells is measured by placing them in the insert well of the manometer vessel and determining the CO₂ which is liberated from a definite amount of bicarbonate contained in the bottom of the main vessel after adding citric acid from the side arm.

TABLE I

EFFECT OF CO ON THE OXIDATIVE AND THE SPLITTING METABOLISM OF 85 MG. OF PINE NEEDLES AT 20° C.

| GASES | O ₂ CONSUMED IN RESPIRATION | CO ₂ FORMED IN RESPIRATION | CO ₂ FORMED IN SPLITTING |
|--|--|---------------------------------------|-------------------------------------|
| | <i>cu. mm.</i> | <i>cu. mm.</i> | <i>cu. mm.</i> |
| 8% O ₂ - 92% N ₂ | 100 | 100 | None |
| 8% O ₂ - 92% CO | 32 | 32 | 61 |
| 100% N ₂ | None | None | 77 |
| 100% CO | None | None | 77 |

The quotient, $\frac{\text{CO}_2 \text{ formed in respiration}}{\text{O}_2 \text{ consumed in respiration}}$, determined by this method is

1. While in an O₂ and N₂ atmosphere a non-oxidative metabolic process does not occur, in an atmosphere of O₂ and CO the CO₂ formed by splitting amounts to 80 per cent. of the CO₂ formed under anaerobic conditions.

Summary

1. The purpose of the work reported in this paper was to determine the chemical nature of the oxygen-transferring ferment in plants, and its possible identity with one of the two oxidation ferments already known, that is, with the iron-free yellow ferment which is insensitive to carbon monoxide, or phaeohaemin which is sensitive to carbon monoxide.

2. The effect of carbon monoxide on the respiration of stamens of plums, stamens and pistils of daffodils, Spanish moss, green pine needles, and green leaves of tobacco, plum, and oleander plants has been examined. It was found that the oxygen-transferring ferment of respiration in plants is a compound of a heavy metal, for in all these plant cells carbon monoxide produces a strong reversible inhibition of respiration, and instead of the respiratory metabolism a non-oxidative splitting metabolism appears. The oxygen-transferring ferment in plants is a compound of iron: for, the ferment-CO compound dissociates in light; the carbon monoxide inhibition of respiration

ceases if the cells are illuminated, and respiration again takes the place of the non-oxidative splitting metabolism.

3. The sensitivity of the respiration ferment toward carbon monoxide, and the absorption of light by the respiration ferment-CO compound are of the same magnitude in the cells of the higher plants as in animal cells and aerobic bacteria. All these findings indicate that the oxygen-transferring ferment of respiration in plant cells is identical with the oxygen-transferring ferment phaeohaemin.

The writer wishes to express cordial thanks to Dr. F. A. WOLF of the Department of Biology at Duke University for providing large quantities of the infected tobacco leaves for one of his experiments.

DUKE UNIVERSITY

DURHAM, NORTH CAROLINA

LITERATURE CITED

1. BERNARD, CL. Leçons sur les phénomènes de la vie. p. 278. Paris, 1878.
2. BONNIER, G., and MANGIN, L. Recherches sur l'action chlorophyllienne séparée de la respiration. Ann. Sci. Nat. (Botan.) 7th ser. 3: 1-44. 1886.
3. EMERSON, R. The effect of certain respiratory inhibitors on the respiration of *Chlorella*. Jour. Gen. Physiol. 10: 469-477. 1927.
4. GAFFRON, H. Über die Kohlensäureassimilation der roten Schwefelbakterien II. Biochem. Zeitschr. 279: 1-33. 1935.
5. ————. Über die Unabhängigkeit der Kohlensäureassimilation der grünen Pflanzen von der Anwesenheit kleiner Sauerstoffmengen und über eine reversible Hemmung der Assimilation durch Kohlenoxyd. Biochem. Zeitschr. 280: 337-359. 1935.
6. KEMPNER, W. Wirkung von Blausäure und Kohlenoxyd auf die Buttersäuregärung. Biochem. Zeitschr. 257: 41-56. 1933.
7. ————, and KUBOWITZ, F. Wirkung des Lichtes auf die Kohlenoxydhemmung der Buttersäuregärung. Biochem. Zeitschr. 265: 245-252. 1933.
8. PADOA, M., and VITA, N. Über die Wirkung von Kohlenoxyd auf frische Pflanzen. Biochem. Zeitschr. 244: 296-302. 1932.
9. SCHLAYER, C. Wirkung des Kohlenoxyds auf die Gärung von Tetanus- und Gasbrandbazillen. Biochem. Zeitschr. 276: 460-463. 1935.
10. WARBURG, O. Über die Wirkung des Kohlenoxyds auf den Stoffwechsel der Hefe. Biochem. Zeitschr. 177: 471-486. 1926.
11. ————. Über die Wirkung von Kohlenoxyd und Stickoxyd auf Atmung und Gärung. Biochem. Zeitschr. 189: 354-380. 1927.

KEMPNER: NATURE OF OXYGEN-TRANSFERRING FERMENT 613

12. ————. Das sauerstoffübertragende Ferment der Atmung. Nobelvortrag. 1931.
13. ————, and CHRISTIAN, W. Über ein neues Oxydationsferment und sein Absorptionsspektrum. *Biochem. Zeitschr.* **254**: 438–458. 1932.
14. ————. Über das gelbe Ferment und seine Wirkungen. *Biochem. Zeitschr.* **266**: 377–411. 1933.
15. WILLSTÄTTER, R., and STOLL, A. Untersuchungen über die Assimilation der Kohlensäure. p. 344. Julius Springer. Berlin, 1918.

***Effect of Low Oxygen Tension upon Respiration
and Fermentation of Isolated Cells***

EFFECT OF LOW OXYGEN TENSION UPON RESPIRA-
TION AND FERMENTATION OF ISOLATED CELLS.

WALTER KEMPNER.

Reprinted from the PROCEEDINGS OF THE SOCIETY FOR EXPERIMENTAL BIOLOGY AND
MEDICINE, 1936, 35, 148-151

Reprinted from the PROCEEDINGS OF THE SOCIETY FOR EXPERIMENTAL BIOLOGY AND
MEDICINE, 1936, 35, 148-151

8888 P

Effect of Low Oxygen Tension upon Respiration and Fermentation of Isolated Cells.

WALTER KEMPNER. (Introduced by W. A. Perlzweig.)

*From the Department of Medicine, Duke University School of Medicine,
Durham, N. C.*

Warburg has devised the methods which make it possible to examine the respiration of isolated cells at a constantly maintained equilibrium between the cell and the gas medium and to measure quantitatively the influence of various oxygen tensions upon respiration in such a way as to eliminate diffusion as a limiting factor.¹ By these methods Warburg has determined the effect of low oxygen tensions upon the respiration of bacteria and isolated animal cells. He found the rate of oxidation of the nucleated red blood cells of geese, which he examined at 0°C., to be unchanged at oxygen pressures varying between 5 and 75 mm. Hg. (=0.7 and 10 vol. % O₂).² In *micrococcus candidans*, at 1°C. the rate of respiration even at an oxygen tension of 10⁻⁵ atm. (=0.0076 mm. Hg., =0.001 vol. % O₂) was the same as in air.³ Also the respiration of non-nucleated red blood cells of rabbits poisoned by phenylhydrazin, examined at 38°C. showed no dependence upon oxygen tension.⁴ Since these investigations it has been a generally accepted axiom of physiology that cell respiration is independent of variations of oxygen tension.⁵

The only exceptions seemed to be the nitrogen-fixing bacteria and pneumococcus which were both examined with the Warburg methods under conditions of optimal gas diffusion. The relative rate of

¹ Warburg, O., *Stoffwechsel der Tumoren*, Berlin, 1926.

² Warburg, O., *Erg. d. Physiol.*, 1914, 14, 253.

³ Warburg, O., and Kubowitz, F., *Biochem. Z.*, 1929, 214, 5.

⁴ Warburg, O., Kubowitz, F., and Christian, W., *Biochem. Z.*, 1931, 242, 170.

⁵ Meyerhof, O., *Chemische Vorgänge in Muskel*, Berlin, 1930, p. 9.

EFFECT OF LOW OXYGEN TENSION

respiration of azotobacter at 2 vol. % O_2 and in air was 1:2 (Meyerhof⁶) and that of pneumococcus at 2 vol. % O_2 and in air was even 1:4.5 (Schlayer⁷).

I have examined the effect of oxygen tension upon the rate of respiration of isolated animal cells and bacteria at temperatures between 1° and 42°C. Like Warburg, I did not find any difference in the rate of respiration at oxygen tensions between 1 and 20 vol. % O_2 when working at low temperatures, nor did I find any difference at temperatures between 25° and 42°C. in old bacterial cultures, in injured nucleated blood cells, and in non-nucleated human erythrocytes. Young undamaged body cells, however, examined in their physiological environment, and bacteria in suspension media, in which they were able to grow, showed at temperatures between 25° and 42°C. a great decrease in respiration at an oxygen tension as high as 5 vol. % as compared with air (20 vol. % O_2). Under these conditions I have found a marked effect on respiration of variations of oxygen tension in *Micrococcus candidans*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas pyocyanea*, *Escherichia coli*, *Monilia albicans*, human erythroblasts and leucemic leucocytes, red blood cells of fowls and alligators and young green plant cells (pine needles). The dependence of the respiration upon oxygen tension is greatest in the youngest cells and is influenced by physical and chemical changes in the cell medium such as pH, CO_2 concentration and bicarbonate content.

There was no increase in the fermentative metabolism corresponding to the decrease of respiration. Although the rate of respiration, e. g., of geese erythrocytes, was decreased by 60% at an oxygen tension of 3.4 vol. % compared with the respiration in air, no acid formation occurred.

A typical experiment is described in the following:

Blood was taken under sterile conditions in heparin (5 mg. in 20 cc.) from the wing vein of a goose without contamination with tissue fluid. The blood was gently shaken with glass beads for 5 minutes and filtered through gauze. It was then saturated at 40°C. with a gas mixture of 2.5% CO —5% CO_2 —18.75% O_2 , 73.75% N_2 , so that the hemoglobin oxygen was almost completely displaced by CO ,⁸ and pipetted into 4 Warburg manometer vessels of about 18 cc. capacity. Vessel 1 (4 cc. of blood) and vessel 2 (2 cc.) were saturated again with the same gas mixture while shaking in the thermostat. Vessel 3 (4 cc.) which contained 0.2 cc. 10% $NaOH$ in the side bulb, in order to absorb the carbon dioxide, was saturated with

⁶ Meyerhof, O., and Schulz, W., *Biochem. Z.*, 1932, **250**, 35.

⁷ Schlayer, C., *J. Bact.*, 1936, **31**, 181.

⁸ Warburg, O., *Biochem. Z.*, 1929, **214**, 4.

EFFECT OF LOW OXYGEN TENSION

2.5% CO—18.75% O₂—78.75% N₂. Vessel 4 was saturated with 5% CO₂—95% CO in order to produce anaerobic conditions. The dry weight of cells in 4 cc. blood was 237 mg., the temperature was 40°C., the shaking speed 160-210 oscillations per minute. The readings were made every 5 minutes without stopping the manometers.

In vessels 1, 2, and 3 the metabolism was determined at 18.75% O₂ for a period of 30 minutes. Then the vessels were saturated in the thermostat with a gas mixture containing 3.4% O₂ and an equal proportion of CO to O₂ (0.45% CO—3.4% O₂—5% CO₂—91.15% N₂). After another 30 minutes' observation the vessels were resaturated with the original gas mixtures of 18.75% O₂ concentration. CO₂ retention and metabolism figures were calculated according to Warburg.⁴

Table I shows that at 18.75% O₂ there is only a very small difference in the absolute respiration values between the blood cells examined at a normal pH and a physiological CO₂ tension and the cells examined at an alkaline pH in the absence of CO₂. Decrease of oxygen tension, however, causes in the physiological medium a great decrease in respiration which is completely reversible if the cells are not kept under low oxygen pressure too long; whereas in the alkaline carbon dioxide free medium the respiration rate remains nearly unchanged.

TABLE I.
Metabolism of 100 mg. Blood Cells of Anemic Goose in 1 Hour at Various Oxygen Tensions, 40° C.

| Vol. % O ₂ | e.mm. oxygen consumed | | e.mm. lactic acid formed (1 e.mm. = 0.004 mg.) in unchanged physiological medium with 5 vol. % CO ₂ |
|-----------------------|---|--|---|
| | in alkaline, CO ₂ free medium | in unchanged physiological medium with 5 vol. % CO ₂ | |
| 18.75 | —101 | —106 | + 16 |
| 3.4 | — 96 | — 44 | + 0 |
| 0 | | | +190 |

This proves that the decrease of respiration at low oxygen tensions is not due to insufficient diffusion of oxygen from the gas space or the suspension medium into the cells, since all the conditions which might influence the diffusion (cell volume, oxygen tension, shaking speed) are identical throughout.

The fact that cellular respiration in an alkaline, CO₂-free medium as well as at low temperatures is largely independent of oxygen tension, is probably the chief reason why previous workers did not find the marked effect of oxygen tension upon respiration. Even the dissociation of oxyhemoglobin at decreasing oxygen tension might have been overlooked if the dissociation had only been measured at low

EFFECT OF LOW OXYGEN TENSION

temperatures and in alkaline CO₂-free media. For each of these three factors affects the affinity of hemoglobin for oxygen to such an extent that one must go down to very low oxygen tensions before the dissociation of oxyhemoglobin begins.

In complete absence of oxygen a great amount of lactic acid is formed while at an oxygen concentration of 3.4 vol. % in spite of 60% decrease in respiration no lactic acid appears. No relationship was found between the decrease in respiration and the occurrence of glycolysis. The Pasteur reaction, the disappearance of the anaerobic splitting metabolism under aerobic conditions, was not dependent upon the rate of respiration but upon the concentration of oxygen.

*The Influence of Oxygen Tension on the
Respiration of Pneumococci (Type I)*

THE INFLUENCE OF OXYGEN TENSION ON THE
RESPIRATION OF PNEUMOCOCCI (TYPE I)

BY

C. SCHLAYER

*Departments of Medicine and Physiology, Duke University School of Medicine,
Durham, North Carolina*

REPRINTED FROM

JOURNAL OF BACTERIOLOGY, VOL. 31, No. 2,
FEBRUARY, 1936

Reprinted from JOURNAL OF BACTERIOLOGY
Vol. 31, No. 2, February, 1936

THE INFLUENCE OF OXYGEN TENSION ON THE RESPIRATION OF PNEUMOCOCCI (TYPE I)

C. SCHLAYER

*Departments of Medicine and Physiology, Duke University School of Medicine,
Durham, North Carolina*

Received for publication, September 4, 1935

Decrease of oxygen tension in the tissues occurs in every stasis of blood and lymph. Determinations of the oxygen tension in fluids taken from an inflamed area in the course of an experimentally-produced sterile inflammation showed, for example, after twenty-four hours an oxygen pressure of 70 mm.Hg., after forty-five hours of 40 mm.Hg. and after sixty-five hours an oxygen pressure of 20 mm.Hg. (Kempner and Peschel, 1930). This fact suggests the question: What influence have relatively low oxygen pressures upon the vital reactions of pathogenic bacteria?

This question can only be answered experimentally by a method which makes it possible to measure quantitatively the energy-yielding processes in bacteria under a constantly maintained equilibrium between reacting cells, culture medium and gas milieu. Some older investigations mentioned in the bacteriologic literature (Kolle and Wassermann, 1929), which were not based on this constantly-maintained equilibrium, are of little value for the solution of this particular problem. They concern themselves more with the diffusion of different gases in different test vessels and culture media than with the effect of these gases upon the reactions of the organism under experimental observation. Then, too, these studies were limited to the acceleration and retardation of bacterial growth, which often is not influenced by factors which inhibit or increase other specific cell reactions, as, for example, lactic or butyric acid fermentation, the forming of hydrogen peroxide and respiration.

The quantitative determination of the metabolic changes in living cells under exact physiological conditions is possible with the manometrical methods of O. Warburg (1927). Experiments carried out by these methods have shown that, with the exception of the nitrogen-fixing *Bacterium azotobacter* (Meyerhof and Schulz, 1932), the respiration of animal body cells, yeast cells and many bacteria is largely independent of variations of oxygen pressure. Even at an oxygen tension of 10^{-5} atm. (0.008 mm.Hg.) the respiration of *Micrococcus candidans*, for instance, was not less than in air (Warburg and Kubowitz, 1929). I have examined *Escherichia coli*, *Pseudomonas pyocyanea*, *Vibrio Metchnikovii*, and *Staphylococcus aureus* at oxygen pressures of 5 to 150 mm.Hg. and have also not found any influence of oxygen pressure on their respiration. In all of these cells the respiration is inhibited by HCN and CO, that is to say, the respiration is catalyzed by a haemin-containing ferment (Warburg, 1931).

An entirely different type of respiratory mechanism was found in the pneumococcus, *Bacillus acidophilus* and *Bacillus acidificans-Delbrueckii*. In these bacteria, which lack catalase, the oxygen consumed in respiration is converted into hydrogen peroxide (McLeod and Gordon, 1922, 1924, 1925; Avery and Morgan, 1924; Bertho and Glueck, 1932; Sevag, 1933; Sevag and Maiweg, 1934). Their respiration is not inhibited by HCN (Meyerhof and Finkle, 1925; Bertho and Glueck, 1932; Sevag, 1933) or by CO (Bertho and Glueck, 1932; Fujita and Kodama, 1934, 1935), that is to say, is not catalyzed by a haemin respiration ferment but by an iron-free ferment, the so-called Warburg yellow oxidation ferment (Warburg and Christian, 1932, 1933), which was demonstrated spectroscopically in *Bacillus acidificans-Delbrueckii* and could be isolated from the cells.

The rate of respiration catalyzed by the yellow ferment itself, separated from the cells, proved to be dependent on oxygen tension: at an oxygen tension of 760 mm.Hg. the oxygen consumption was 4.8 times as much as at a tension of 38 mm.Hg. (Warburg and Christian, 1932). The respiration of the bacteria containing this ferment, however, did not appear to be dependent on variations of oxygen pressure, as shown by studies on *Bacillus*

OXYGEN TENSION ON RESPIRATION OF PNEUMOCOCCI 183

acidophilus and *B. acidificans-Delbrueckii* (Bertho and Glueck, 1932). Since these determinations extended only to partial pressures of oxygen between 76 and 760 mm.Hg., I have examined the effect of still lower oxygen pressures (15 to 76 mm.Hg.) upon the respiration of these bacteria, but found no difference in the magnitude of respiration either. Likewise I could not discover any effect of oxygen tension (varied between 2 and 20 vol. per cent O_2) upon the respiration of *Clostridium butyricum* which also contains large amounts of the yellow ferment (Warburg and Christian, 1933).

This paper deals with the influence of different oxygen pressures on the respiration and growth of pneumococci.

EXPERIMENTAL

Cultures of pneumococci, type I, two to seventy hours old, grown in broth or on blood agar, were used.¹ In experiments in which very young pneumococci were needed, broth cultures were put into manometer vessels in order to determine exactly the moment at which growth began. The bacteria were suspended in broth (0.5 per cent glucose, pH 7.3) or in a 1:1 mixture of broth and salt solution (0.03 M phosphate, pH 7.3 + 0.131 M NaCl + 0.006 M KCl + 0.03 M glucose) or in salt solution of the above composition plus 0.18 gram magnesium sulphate per liter (Fujita and Kodama, 1934, 1935). To 2 cc. of bacterial suspension 0.2 cc. of a colorless blood (stromata of 500 mgm. erythrocytes) or potato (50 mgm.) catalase solution, were added. In this way the hydrogen peroxide formed in respiration is immediately split into H_2O and O_2 and the bacteria cannot be damaged by an accumulation of hydrogen peroxide.² 2 cc. of the solution,

¹ I wish here to repeat my cordial thanks to Dr. W. H. Kelley and Dr. E. N. Scadron for their courtesy in providing me with the cultures.

² In order to examine the bacteria under conditions similar to those in the tissues, one has to use media with optimal concentration of catalase, just as one uses buffers to counteract the damaging effect of pH changes. Experiments on the respiration of pneumococci in media which contain no catalase, show a decrease of the respiration rate even after a period of ten to twenty minutes (Finkle, 1931; Sevag, 1933; Sevag and Maiweg, 1934). In the body an accumulation of hydrogen peroxide is not probable because of the large number of erythrocytes present in the inflamed lung.

0.1 to 2 mgm. of pneumococci, weighed after centrifugalizing and drying at 100°C. (Peschel, 1930), were put into manometer vessels. To determine the oxygen consumption the CO_2 produced was absorbed by KOH (0.4 cc. 6 per cent KOH). To determine the respiratory quotient the differences of gas pressures were measured in the presence and absence of KOH; the retention

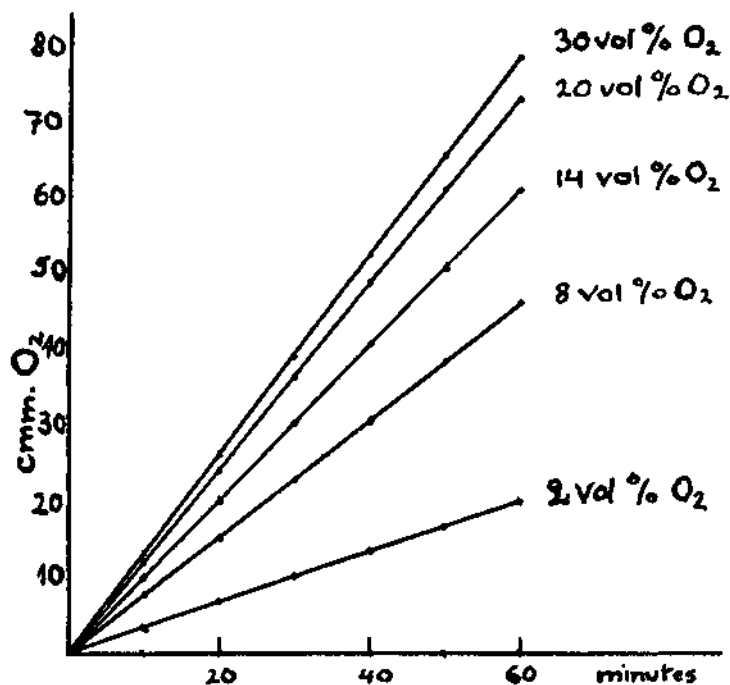


FIG. 1. RESPIRATION OF 0.3 MG. PNEUMOCOCCI AT VARIOUS OXYGEN PRESSURES

The points in the curves show the experimentally determined total amount of oxygen consumed in the designated time.

of CO_2 by bacteria and phosphate solution was measured by putting the experimental liquid into the insert well of the manometer vessel and determining the CO_2 which was liberated from a definite amount of bicarbonate, contained in the bottom of the main vessel, on adding lactic acid from the side-arm (Warburg, Kubowitz and Christian, 1931). Mixtures of oxygen-nitrogen or oxygen-argon of varying percentage were prepared over mer-

OXYGEN TENSION ON RESPIRATION OF PNEUMOCOCCI 185

cury in a gasometer of 2-liters capacity. Fluids and vessels were saturated with these gas mixtures and the metabolism of the bacteria was measured at a temperature of 37°C. The vessels were shaken in the thermostat at such a rate that a further increase of the shaking speed did not change the results.

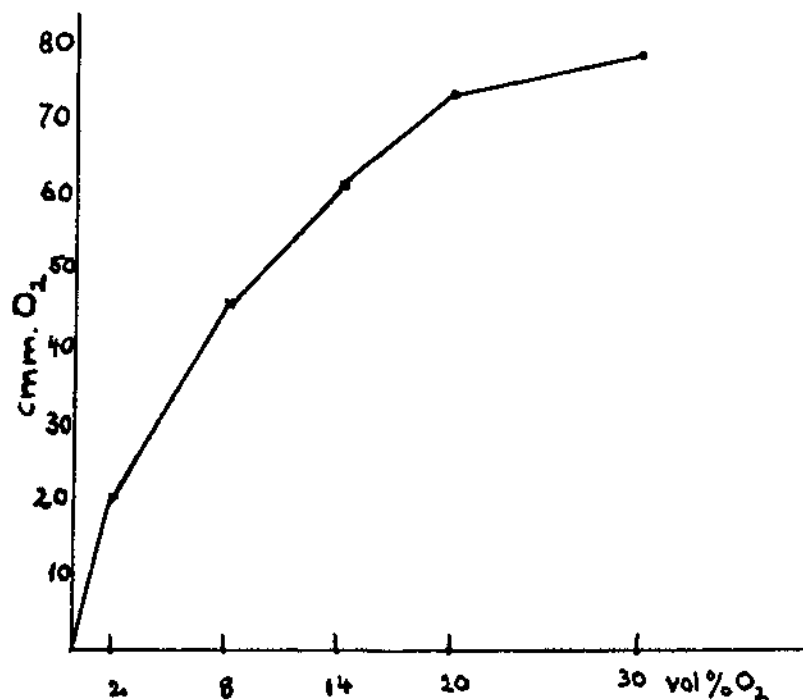


FIG. 2. RATE OF RESPIRATION OF 0.3 MG. PNEUMOCOCCI IN 1 HOUR AS FUNCTION OF OXYGEN PRESSURE

As shown by figures 1 and 2 the respiration of pneumococci depends to a high degree on the oxygen tension. At 20 vol. per cent O₂ (152 mm.Hg.) the oxygen consumption of 0.3 mgm. pneumococci in one hour amounts to 73 cmm.; the amount of oxygen consumed by the same quantity of bacteria in the same time at an oxygen pressure of 2 vol. per cent (15.2 mm.Hg.) is only 20 cmm. At a partial oxygen pressure of 15 mm.Hg. the respiration of pneumococci in comparison with their respiration

under an oxygen pressure of 150 mm.Hg. is lowered by 72 per cent. The respiratory quotient at the various oxygen tensions was found to be between 0.8 and 0.9.

The oxygen partial pressure optimal for the respiration of pneumococci is between 20 and 30 vol. per cent. At higher oxygen pressures the rate of respiration decreases. The same amount of bacteria which consume in one hour at 20 vol. per cent oxygen (152 mm.Hg.) 73 cmm. O_2 , consume at 100 vol. per cent O_2 (760 mm.Hg.) only 51 cmm. The rate of respiration in pure oxygen is lowered by 30 per cent compared with the rate of respiration in air.

The dependence of respiration on oxygen pressure is influenced by the same factors which influence the absolute amount of respiration, that is, the manner of cultivation, the suspension medium (pH, concentration of oxidizable substances, $MgSO_4$), and the age of the bacteria. Pneumococci grown on blood agar for forty-five hours showed at an oxygen pressure of 20 vol. per cent a respiration rate twice as high as at 2 vol. per cent O_2 . In pneumococci of the same seeding, collected after fifteen hours, the respiration rate was at 20 vol. per cent O_2 four and one-half times higher than at 2 vol. per cent O_2 . The highest proportion found between the respiration at 2 and 20 vol. per cent O_2 was 1:5.4.

According to Warburg and Christian (1933) and Warburg (1934) oxygen transfer is not the physiological function of the yellow ferment, for the oxidation which it catalyzes is either quantitatively negligible or even damages the cells. Aerobic cells do not need the energy provided by the oxidation through the yellow ferment, though they also contain it in small amounts, since they obtain their life-sustaining energy by the haemin-ferment respiration. Anaerobic cells without haemin-respiration-ferment and containing large amounts of yellow ferment, obtain most of their energy by non-oxidative splitting processes and, because they lack catalase, they are easily damaged by the accumulation of the hydrogen peroxide which they form under aerobic conditions. (The damaging effect of an accumulated end-product of metabolism does not, however, indicate that this metabolism is not fundamentally necessary to cellular life.)

OXYGEN TENSION ON RESPIRATION OF PNEUMOCOCCI 187

Since the respiration of pneumococci, catalyzed by the yellow ferment, was found to be dependent on oxygen tension, the ques-

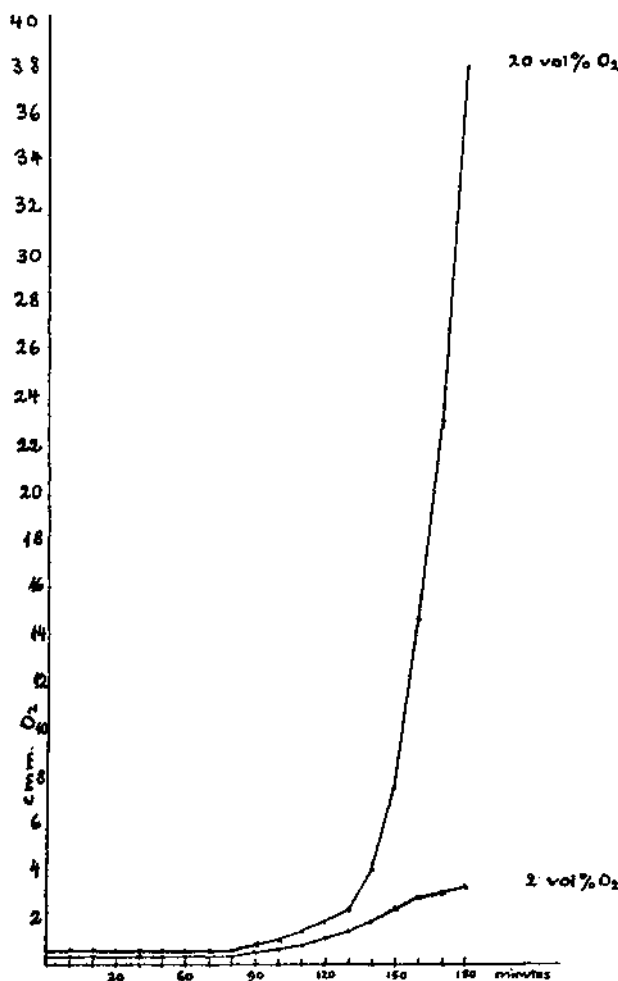


FIG. 3. GROWTH OF PNEUMOCOCCI (WEIGHT AT THE BEGINNING OF THE EXPERIMENT: 0.05 MG.) AT VARIOUS OXYGEN PRESSURES

The points in the curves show the experimentally determined amount of oxygen consumed in periods of 10 minutes.

tion arose: Is this oxidative process in the pneumococcus only an accessory chemical function of cells otherwise able to obtain their

energy by non-oxidative ferment reactions, for example, by the splitting of sugar, or is it a physiological, energy-supplying reaction, necessary for the building up of living substance?

To decide this question, we have determined the relation of growth to the rate of respiration at various oxygen tensions. Figure 3 shows the respiration of a growing broth culture of pneumococci at oxygen pressures of 2 vol. per cent and 20 vol. per cent. The points on the curve indicate the amount of oxygen consumed by the culture in periods of ten minutes. The growth of the bacteria is revealed by the increasing rate of respiration under otherwise identical conditions. As we see, the culture, which at a temperature of 37°C. is kept under a tension of 20 vol. per cent O_2 , after an incubation time of one hundred and eighty minutes, consumes by respiration 38 cmm. oxygen in a ten-minute period while the same culture under a tension of only 2 vol. per cent O_2 respire after the same incubation time in a ten-minute period only 3.3 cmm. O_2 . It is evident that pneumococci need the energy supplied by respiration and that, if respiration is inhibited, the energy obtained by fermentation is not sufficient to supply the amount of energy necessary for optimal growth. The velocity of growth is considerably lower at a low oxygen tension.

SUMMARY

Quantitative data are presented showing that respiration and growth processes of type I pneumococci depend upon oxygen tension.

The work here reported was done in the laboratory of Dr. Walter Kempner, Duke Medical School, and I am greatly indebted to him for many valuable suggestions and constant coöperation.

REFERENCES

- AVERY, O. T., AND MCNEILL, J. M. 1924 *J. Exper. Med.*, **39**, 347, 357.
AVERY, O. T., AND MORGAN, H. J. 1924 *J. Exper. Med.*, **39**, 275.
BERTHO, A., AND GLUECK, H. 1932 *Ann. Chem.*, **494**, 159.
FINKE, P. 1931 *J. Exper. Med.*, **53**, 661.
FUJITA, A., AND KODAMA, T. 1934 *Biochem. Z.*, **273**, 194.
1935 *Biochem. Z.*, **277**, 17.

OXYGEN TENSION ON RESPIRATION OF PNEUMOCOCCI 189

- KEMPNER, W., AND PESCHEL, E. 1930 *Z. f. klin. Med.*, **114**, 453.
- KOLLE-WASSERMANN. 1929 *Handbuch der pathogenen Mikroorganismen*, **1**, 119.
- MCLEOD, J. W., AND GORDON, J. 1922 *J. Path. and Bact.*, **25**, 139.
 1925 *J. Path. and Bact.*, **26**, 326; **26**, 332; **28**, 155.
 1922 *Biochem. J.*, **16**, 499.
 1924 *Biochem. J.*, **18**, 937.
- MEYERHOF, O., AND FINKLE, P. 1925 *Chem.-Ztg.*, **12**, 157.
- MEYERHOF, O., AND SCHULZ, W. 1932 *Biochem. Z.*, **250**, 35.
- PESCHEL, E. 1930 *Klin. Woch.*, **23**, 1061.
- SEVAG, M. G. 1933 *Ann. Chem.*, **507**, 92; *Biochem. Z.*, **267**, 211.
- SEVAG, M. G., AND MAIWEG, Z. 1934 *J. Exper. Med.*, **60**, 95.
- WARBURG, O. 1927 *Stoffwechsel der Tumoren*. Berlin, Springer.
- WARBURG, O. 1931 Nobel-Vortrag.
- WARBURG, O. 1934 *Naturwissenschaften*, **22**, 446.
- WARBURG, O., AND CHRISTIAN, W. 1932 *Biochem. Z.*, **254**, 438.
- WARBURG, O., AND CHRISTIAN, W. 1933 *Biochem. Z.*, **266**, 377.
- WARBURG, O., AND KUBOWITZ, F. 1929 *Biochem. Z.*, **214**, 5.
- WARBURG, O., KUBOWITZ, F., AND CHRISTIAN, W. 1931 *Biochem. Z.*, **242**, 177.

*Über das Verhalten des Fermentes der
Milchsäuregärung beim Glykogenzerfall
[On the Reaction of the Enzyme of Lactic Acid
Fermentation during Pathologic Glycogen Breakdown]*

**On the Reaction of the Enzyme of Lactic Acid
Fermentation during Pathologic Glycogen Breakdown
by Ruth Lohmann**

Pathologic glycogen breakdown is a non-specific metabolic disturbance, which occurs in many very different diseases. There is no doubt that the capacity of skeletal muscle to form lactic acid plays a significant role in this disturbance. In a condition of pathologic glycogen breakdown, muscle mash of animals—warm and cold blooded—forms lactic acid to the same extent and as quickly as normal muscle. Also in response to a special stimulus, in this case achieved by caffeine, the enzyme reacts with the same increased formation of lactic acid. This shows that the metabolic disturbances of pathologic glycogen breakdown in muscle mash cannot be proven to be due to damage of the catalyzing enzyme of lactic acid formation.

Sonderabdruck aus
 „Archiv f. experim. Pathologie und Pharmakologie“ 182, 239, 1936.
 Verlag von F. C. W. Vogel, Berlin W 9.

Aus der II. Medizinischen Klinik der Charité, Berlin.
 (Direktor: Prof. Dr. G. von Bergmann.)

Über das Verhalten des Fermentes der Milchsäuregärung beim Glykogenzerfall.

Von

Ruth Lohmann.

(Eingegangen am 11. April 1936.)

Durch die Arbeiten von C. Brentano¹ ist uns der Begriff des pathologischen Glykogenzerfalls geläufig geworden. Brentano hat nachgewiesen, daß es sich dabei um eine unspezifische Stoffwechselstörung handelt, die spontan bei vielen, ganz verschiedenartigen Krankheiten auftritt und auch künstlich z. B. durch Gifte oder Narkotica am Tier erzeugt werden kann. Über den Entstehungsmechanismus dieses Glykogenzerfalls ist aber noch nichts bekannt. Es ist keine Frage, daß das Milchsäurebildungsvermögen der Skelettmuskulatur eine wesentliche Rolle innerhalb dieser Stoffwechselstörung spielt; denn zu den Symptomen, die den Glykogenzerfall charakterisieren, gehört eine von der Norm abweichende Adrenalinwirkung: Während normalerweise nach einer subcutanen Adrenalininjektion eine erhebliche Zunahme der Blutmilchsäure erfolgt, bleibt diese Zunahme aus, wenn sich die Skelettmuskulatur im Zustande des Glykogenzerfalls befindet².

Es erschien daher zweckmäßig, zu klären, ob es sich bei dem Zustande des Glykogenzerfalls vielleicht um eine Schädigung des die Milchsäurebildung katalysierenden Fermentes handelt. Eine solche Fermentschädigung müßte sich in einer Abnahme der Milchsäurebildung im Muskelbrei äußern; denn die Quelle der im Blute nach Adrenalin normalerweise auftretenden Milchsäure ist in erster Linie das Muskelglykogen (Cori und Cori³). Es ist daher anzunehmen, daß eine Störung der Milchsäurebildung nach Adrenalin ihren Sitz bzw. ihren Ausgangspunkt in der Muskulatur haben muß.

Deshalb wurde das Milchsäurebildungsvermögen von Warmblüter- und Kaltblütermuskeln im Zustande des Glykogenzerfalls verglichen mit dem Milchsäurebildungsvermögen der entsprechenden Muskeln von Tieren in normaler Stoffwechsellage. Als Test für das Bestehen eines Glykogenzerfalls diente der Nachweis von Kreatin im Harn; denn nach Brentano⁴ ist die Kreatinurie ein diagnostisches Zeichen für Glykogenzerfall. Zur

¹ Brentano: Verhandlungen der Deutschen Gesellschaft für innere Medizin. XLVII. Kongreß Wiesbaden 1935. — ² Brentano: Z. f. klin. Med. 120 (1932).

— ³ Cori u. Cori: J. of biol. Chem. 79 (1928). — ⁴ Brentano: Dtsch. med. Wschr. 1932, Nr. 18.

experimentellen Erzeugung der Kreatinurie bzw. des Glykogenzerfalls dienten Adrenalin, Phlorrhizin oder Urethan. Die Untersuchungen erfolgten am Muskelbrei von Kaninchen, Ratten und Fröschen. Die jeweils zum Versuch verwendeten Tiere wurden mehrere Tage vor dem Versuch hinsichtlich Ernährung und Aufbewahrung unter gleichen Bedingungen gehalten.

Ober- bzw. Unterschenkelmuskulatur wurde — bei Warmblütern im Ätheraustausch, bei Fröschen nach Dekapitation — freipräpariert und am Körper in flüssiger Luft gefroren. Dann wurden die Muskeln vom Körper losgetrennt und unter gelegentlichem Zugießen von flüssiger Luft durch eine Fleischmaschine gedreht bzw. in einem Mörser zerstoßen. Der fein zermahlene, gefrorene Muskelbrei wurde in einzelne Portionen von etwa 2—2,5 g geteilt. Eine Portion diente zur Glykogenbestimmung (nach Pflüger), die übrigen wurden in die Versuchsgefäße — weithalsige Glasgefäße von ungefähr 100 ccm Rauminhalt mit eingeschliffenem Stopfen — gebracht und gewogen. Zur Aufrechterhaltung der Wasserstoffionenkonzentration in Muskelbrei und Suspensionsflüssigkeit dienten Phosphatpufferlösungen (m/7,5) von $p_H = 7,0$. Blausäurezusatz bewirkte die erforderliche Hemmung der Atmung. Es wurden zu jeder Muskelportion 10 ccm physiologische Kochsalzlösung, 10 ccm Phosphatlösung und 0,6 ccm n/20 HCN gegeben. Die Gefäße kamen für die Dauer des Versuches in einen Brutschrank mit einer Temperatur von 37° C. Zur Beendigung des Versuches wurde die Milchsäurebildung durch Enteiweißung (Zusatz von 10 ccm einer 10%igen Metaphosphorsäurelösung) unterbrochen; die zur Bestimmung der Anfangswerte dienenden Muskelportionen wurden nach Herstellung des Muskelbreies sofort enteiweißt. Nach der Enteiweißung wurde filtriert und das Filtrat zur Milchsäurebestimmung nach Mendel-Goldscheider verarbeitet.

Der Glykogenzerfall ist eine Stoffwechselstörung, die die gesamte Skelettmuskulatur betrifft. Bei den Versuchen war es daher natürlich nicht möglich, analoge Muskeln desselben Tieres für die vergleichenden Bestimmungen zu verwenden; sondern um einen normalen und einen im Glykogenzerfall befindlichen Muskel zu vergleichen, mußten jeweils zwei Tiere verwendet werden. Gegen dieses Vorgehen bestehen keine Bedenken; denn wie Vorversuche zeigten, findet sich kein nennenswerter Unterschied in Glykogengehalt und Milchsäurebildung des Muskels bei Tieren derselben Tierart, sofern sie unter den gleichen Bedingungen gehalten wurden.

Läßt man Muskelbrei unter den oben angegebenen Bedingungen stehen, so geht die spontane Milchsäurebildung etwa eine Stunde lang vor sich. Dann ist kein weiteres Ansteigen der Milchsäure mehr festzustellen, d. h. es ergibt sich ein Endwert, die Milchsäurebildung hört auf. Wie Tabelle I zeigt, ist beim Muskel kreatinurischer Tiere dieser Endwert nach 60 Minuten ebenso erreicht wie bei Normaltieren. Daraus geht schon hervor — was durch Glykogenbestimmungen bestätigt wurde —, daß

Über das Verhalten des Ferments der Milchsäuregärung. 241

Tabelle 1. Milchsäurewerte nach 60 Minuten im Muskelbrei von Tieren mit und ohne Glykogenzerfall.

| Versuchstier | Kreatinurie (Glykogen- zerfall) | Muskelglykogen bei Versuchs- beginn in ‰ | Milchsäure in mg‰ | |
|---------------------|---------------------------------------|--|-------------------|---------|
| | | | Anfangswert | Endwert |
| Ratte | — | 0,464 | 51 | 409 |
| " | + | 0,451 | 49 | 421 |
| Kaninchen | — | 0,642 | 95 | 480 |
| " | + | 0,628 | 101 | 492 |
| Ratte | — | 0,501 | 47 | 390 |
| " | + | 0,510 | 49 | 381 |
| Kaninchen | — | 0,568 | 70 | 502 |
| " | + | 0,537 | 65 | 489 |
| Ratte | — | 0,459 | 51 | 393 |
| " | + | 0,382 | 60 | 406 |

das Ausgangsmaterial für die Milchsäurebildung im Muskel, das Glykogen, auch bei den kreatinurischen, also im Glykogenzerfall befindlichen Tieren ausreichend vorhanden war. Diese für die vorliegenden Versuche natürlich notwendige Voraussetzung ist erfüllt, wenn Tiere zum Versuch benutzt werden, die die Stoffwechselstörung erst kurze Zeit aufweisen und bei denen infolgedessen eine wesentliche Abnahme des Glykogengehaltes noch nicht stattgefunden hat.

Der Endwert der Milchsäuremenge wird also in beiden Muskeln in gleicher Höhe erreicht. Es blieb festzustellen, ob auch die Geschwindigkeit der Milchsäurebildung, die zu diesem Endwert führt, zwischen normalen und kreatinurischen Tieren übereinstimmt. Um dies zu prüfen, wurde die Milchsäurebildung nach 10, 20 und 30 Minuten unterbrochen und der jeweils erreichte Milchsäurewert gemessen.

Tabelle 2. Milchsäurewerte nach 10, 20 und 30 Minuten im Muskelbrei von Tieren mit und ohne Glykogenzerfall.

| Versuchstier | Kreatinurie (Glykogen- zerfall) | Milchsäure in mg‰ | | | |
|-----------------|---------------------------------------|-------------------|--------------|--------------|--------------|
| | | Anfangswert | Nach 10 Min. | Nach 20 Min. | Nach 30 Min. |
| Ratte | — | 49 | 122 | 218 | 272 |
| " | + | 55 | 125 | 232 | 280 |
| " | — | 60 | 218 | 311 | 370 |
| " | + | 52 | 200 | 295 | 351 |
| " | — | 81 | 145 | 230 | 294 |
| " | + | 92 | 153 | 241 | 301 |

Aus Tabelle 2 geht hervor, daß auch in diesen kurzen Zeitabständen gleiche Milchsäuremengen gebildet werden, daß also auch im kurvenmäßigen Ablauf der spontanen Milchsäurebildung des Muskels kein Unterschied zwischen kreatinurischen und nichtkreatinurischen Tieren besteht.

Manometrische Messungen der anaeroben Milchsäurebildung des Muskels — mit der Warburgschen Methode — ergaben dasselbe: Die Muskeln beider Versuchsgruppen bewirkten in gleichen Zeiten die gleiche Kohlensäurebildung und Bicarbonatabnahme.

Schließlich war noch denkbar, daß ein Unterschied der Milchsäurebildung in Muskeln von kreatinurischen und gesunden Tieren auftreten würde, wenn durch einen die Milchsäurebildung steigernden Reiz eine Mehrleistung des Fermentsystems verlangt wird. Adrenalin, das bekannteste Pharmakon, um am lebenden Tier eine vermehrte Milchsäurebildung der Muskulatur zu erzielen, ist am isolierten Muskel unwirksam. Deshalb wurde bei den vorliegenden Versuchen Coffein zur Steigerung der Milchsäurebildung verwendet. Es zeigte sich, daß nach Behandlung des Muskels mit flüssiger Luft Coffein nicht wirkt. Da aber beim Warmblüter zur Muskelverarbeitung flüssige Luft unerlässlich ist — denn ohne diese ist der Anfangswert zu hoch und die Spanne bis zur Erreichung des Endwertes zu klein —, wurde die Coffeinwirkung nur an der Froschmuskulatur untersucht. Die Anaerobiose wurde in diesem Falle nicht durch Blausäure, sondern durch Sättigung des Gefäßes mit Stickstoff erzeugt.

Tabelle 3. Steigerung der Milchsäurebildung nach Coffein im Muskelbrei von Tieren mit und ohne Glykogenzerfall.

| Versuchstier | Kreatinurie (Glykogen- zerfall) | Milchsäure in mg% | | |
|------------------|---------------------------------------|-------------------|--------------------------------|-------------------------------|
| | | Anfangswert | Nach 120 Min.: ohne Coffein | Nach 120 Min.: mit Coffein |
| Frosch | — | 53 | 165 | 221 |
| " | + | 54 | 172 | 233 |
| " | — | 65 | 132 | 202 |
| " | + | 71 | 146 | 214 |

Es ergab sich, daß die Milchsäuremehrbildung nach Coffein im Muskel des kreatinurischen Tieres vollkommen übereinstimmt mit der Milchsäuremehrbildung im Muskel des normalen Tieres.

Zusammenfassung.

Muskelbrei von Tieren — Warmblütern und Kaltblütern — im Zustande des Glykogenzerfalls bildet ebensoviel und ebenso rasch Milchsäure wie der normale Muskel. Auch auf einen besonderen Reiz hin, in diesem Falle durch Coffein ausgelöst, reagiert das Ferment mit der gleichen Milchsäuremehrbildung. Daraus ergibt sich, daß bei der Stoffwechselstörung des Glykogenzerfalls im Muskelbrei eine Schädigung des die Milchsäurebildung katalysierenden Fermentes nicht nachzuweisen ist.

***Der Einfluss des Sauerstoffdrucks auf den Zellstoffwechsel
und der Mechanismus der Blausäurewirkung
[Influence of Oxygen Tension on Cell Metabolism
and the Mechanism of the Cyanide Effect]***

**Influence of Oxygen Tension on Cell Metabolism
and the Mechanism of the Cyanide Effect
by Clotilde Schlayer**

Kempner's experiments with isolated cells (blood cells and bacteria) have shown that there is no "all-or-nothing" law for cellular respiration such as Warburg postulated, but that, on the contrary, under physiological conditions the magnitude of respiration of undamaged nucleated cells depends to a large extent on changes in oxygen tension. For example, with an oxygen tension of 3.3 vol%, the respiration of geese erythroblasts was inhibited 60% compared to the respiration in air.

In spite of the marked decrease in respiration, at the same oxygen pressure of 3.3 vol% there was not even the least increase in lactic acid formation. Such an increase did occur only at much lower oxygen pressures. The Pasteur reaction, i.e., the absence of lactic acid fermentation in the presence of oxygen, is thus based not on an effect of respiration but rather on a direct effect of oxygen on fermentation.

This paper proceeds from Kempner's experiments on the dependence of respiration and fermentation on oxygen tension and deals with the mechanism of the effect of cyanide on cellular metabolism. Respiration and glycolysis are not directly linked reactions; they proceed only in indirect relationship to each other. Each of the two metabolic reactions can be influenced separately: respiration by low oxygen pressure and fermentation by cyanide-ethyl-ester. Cyanide and carbon monoxide act by bonding to the same extent with the enzyme of respiration and the enzyme of fermentation.

Biochemische Zeitschrift

Begründet von C. Neuberg

Unter Mitwirkung von

E. Abderhalden - Halle a. d. S., M. Ascoli - Palermo, L. Asher - Bern, A. Bach - Moskau,
G. Barger - Edinburgh, G. Barkan - Dorpat, M. Bergmann - New York, K. Bernhauer - Prag,
G. Bertrand - Paris, A. Bickel - Berlin, Fr. Boas - München, J. Bodnár - Debreczen, F. Bottazzi -
Neapel, G. Bredig - Karlsruhe i. B., Wl. Butkewitsch - Moskau, T. Chrząszcz - Posen,
R. Doerr - Basel, A. Durig - Wien, R. Ege - Kopenhagen, H. v. Euler - Stockholm, M. Ferreira
de Mira - Lissabon, H. Fink - Berlin, J. Forssman - Lund, E. Freund - Wien, O. Fürth - Wien,
E. Hammarsten - Stockholm, F. Hayduck - Berlin, E. Hägglund - Stockholm, K. Hess - Berlin,
W. Heubner - Berlin, P. Karrer - Zürich, H. Kautsky - Leipzig, G. Klein - Heidelberg,
W. Klein - Bonn, A. J. Kluyver - Delft, H. Kraut - Dortmund, R. Krimberg - Riga, P. A. Levene -
New York, F. Lieben - Wien, K. Lohmann - Heidelberg, H. Lüers - München, Th. Madsen -
Kopenhagen, E. Mangold - Berlin, L. Marchlewski - Krakau, A. McKenzie - Dundee,
Kurt H. Meyer - Gent, O. Meyerhof - Heidelberg, L. Michaelis - New York, H. Molisch - Wien,
K. Myrbäck - Stockholm, W. Nernet - Berlin, K. Noack - Berlin, C. v. Noorden - Wien,
W. Ostwald - Leipzig, A. Palladin - Charkow, J. K. Parnas - Lemberg, W. Pauli - Wien,
W. H. Peterson - Madison, R. Pfeiffer - Breslau, E. P. Pick - Wien, D. N. Prianischnikow -
Moskau, St. J. von Przytycki - Warschau, A. Rippel - Göttingen, H. Sachs - Heidelberg,
T. Sasaki - Tokio, B. Sbarsky - Moskau, A. Scheunert - Leipzig, E. Schmitz - Breslau,
S. P. L. Sörensen - Kopenhagen, H. Steenbock - Madison, W. Straub - München, U. Suzuki - Tokio,
H. Theorell - Stockholm, K. Thomas - Leipzig, F. Verzar - Basel, A. I. Virtanen - Helsingfors,
O. Warburg - Berlin, H. J. Waterman - Delft, E. Widmark - Lund, E. Wöhlich - Würzburg,
N. Zelinsky - Moskau

herausgegeben von

W. Grassmann

Dresden

Sonderabdruck aus 293. Band, 1.—2. Heft

C. Schlayer:

**Der Einfluß des Sauerstoffdrucks auf den Zellstoffwechsel
und der Mechanismus der Blausäurewirkung**



Berlin
Verlag von Julius Springer

1937

Der Einfluß des Sauerstoffdrucks auf den Zellstoffwechsel und der Mechanismus der Blausäurewirkung.

Von
C. Schlayer.

(Aus der Medizinischen Klinik und dem Physiologischen Institut der Duke
Universität, Durham, North Carolina, USA.)

(Eingegangen am 9. Juli 1937.)

Versuche von *W. Kempner*¹ an isolierten Zellen (Blutzellen und Bakterien) haben ergeben, daß ein „Alles oder Nichts-Gesetz“ der Zellatmung, wie es von *O. Warburg*² angenommen wurde, nicht besteht, sondern im Gegenteil die Größe der Atmung ungeschädigter kernhaltiger Zellen unter physiologischen Bedingungen weitgehend von Veränderungen des Sauerstoffdruckes abhängt: Bei einem Sauerstoffdruck von 3,3 Vol.-% z. B. war die Atmung von Gänseerythroblasten, verglichen mit der Atmung in Luft, um 60 % gehemmt.

Trotz der starken Atmungshemmung zeigte sich bei dem gleichen Sauerstoffdruck von 3,3 Vol.-% nicht die geringste Vermehrung der Milchsäurebildung. Diese trat erst bei wesentlich geringeren Sauerstoffdrücken auf. Die *Pasteursche* Reaktion, das Verschwinden der Milchsäuregärung in Gegenwart von Sauerstoff, beruht hiernach also *nicht* auf einer Wirkung der Atmung³, sondern auf einer unmittelbaren Wirkung des Sauerstoffs auf die Gärung.

Die vorliegende Arbeit geht von *Kempners* Versuchen über die Abhängigkeit der Atmung und Gärung vom Sauerstoffdruck aus und beschäftigt sich mit dem Mechanismus der Blausäurewirkung auf den Zellstoffwechsel. Nach *Warburg*⁴ beruht die Wirkung der Blausäure auf ihrer Fähigkeit, mit dem Eisen des Atmungsferments zu reagieren. Die Atmung wird gehemmt, indem die Blausäure die Bindung des Sauerstoffmoleküls an den Atmungskatalysator verhindert. Atmung und Gärung seien miteinander gekoppelt, und zwar sei 1 Molekül veratmeten Sauerstoffs instande, 1 bis 2 Moleküle Milchsäure zum Verschwinden zu bringen („*Meyerhof-Quotient*“). Die durch HCN ge-

¹ *W. Kempner*, Proc. Soc. Exp. Biol. a. Med. 35, 148, 1936; *Derselbe*, J. Cellul. a. Comp. Physiol. 10, 2/3, 1937. — ² *O. Warburg*, Ergebn. d. Physiol. 14, 253, 1914; *O. Warburg* u. *F. Kubowitz*, diese Zeitschr. 214, 5, 1929; *G. Leiner*, ebenda 276, 186, 1935. — ³ *O. Warburg*, Stoffwechsel der Tumoren, Berlin 1926; *Derselbe*, Katalytische Wirkungen, Berlin 1928; *O. Meyerhof*, Chemische Vorgänge im Muskel, Berlin 1930. — ⁴ *O. Warburg*, Katalytische Wirkungen, Berlin 1928.

Einfluß des Sauerstoffdrucks auf den Zellstoffwechsel usw. 95

hemmte Atmung sei im Verhältnis zur anaeroben Milchsäurebildung zu klein, die Glykolyse in Sauerstoff steige deshalb bis zur Größe der anaeroben Glykolyse an.

Ich habe die Wirkung verschiedener Blausäurekonzentrationen auf den Stoffwechsel von Gänseerythroblasten untersucht und mit der Wirkung niedriger Sauerstoffdrucke auf die gleichen Blutsuspensionen verglichen. Bei jeder Blausäurekonzentration, sofern sie eine Hemmung der Atmung verursachte, fand ich eine vermehrte Milchsäurebildung. Dagegen konnte ich durch niedrigen Sauerstoffdruck starke Atmungshemmungen erzeugen, ohne daß eine vermehrte Milchsäurebildung auftrat. Wurden Sauerstoffdruck und Blausäurekonzentration so gewählt, daß in beiden Fällen die Atmung ungefähr um den gleichen Betrag gehemmt war (z. B. in $5 \cdot 10^{-4}$ mol. Blausäure um 62 %, bei 6,1 Vol.-% Sauerstoff um 70 %), so stieg die aerobe Glykolyse in Blausäure von 0 der blausäurefreien Kontrolle auf 71 % der maximalen Glykolyse unter anaeroben Bedingungen, während bei niedrigem Sauerstoffdruck, trotz sogar größerer Atmungshemmung, sich keine Milchsäurebildung zeigte.

Tabelle I. Atmung und Milchsäurebildung von 100 mg (Trockengewicht) Gänseblutkörperchen bei niedrigem Sauerstoffdruck und in Blausäure. 37,8° C.

| Vol.-% O ₂ | mol. HCN | Atmung pro Std. in cmm | Milchsäure- gärung pro Std. in cmm | Hemmung der maximalen Atmung in % | % der maximalen Gärung |
|-----------------------|-------------------|------------------------------|--|---|------------------------------|
| 19,3 | — | 179,0 | 0 | 0 | 0 |
| 19,3 | $5 \cdot 10^{-4}$ | 68,3 | 61,7 | 62 | 71 |
| 6,1 | — | 53,0 | 0 | 70 | 0 |
| 0 | — | 0 | 86,8 | 100 | 100 |

Wenn in beiden Fällen, sowohl in Blausäure als auch bei niedrigem Sauerstoffdruck, eine starke Atmungshemmung gefunden wird, aber nur in einem Falle, in Blausäure, eine vermehrte Milchsäuregärung, so scheint mir dadurch bewiesen, daß das Auftreten der Milchsäuregärung in Blausäure nicht bedingt ist durch die Atmungshemmung als solche, sondern durch eine unmittelbare Wirkung der Blausäure auf die Gärung.

Nehmen wir an, daß die Gärung unter aeroben Bedingungen gehemmt wird durch eine Reaktion des Gärungsferments mit Sauerstoff, so würde die Wirkung der Blausäure auf den Zellstoffwechsel darauf beruhen, daß durch sie nicht nur die Bindung des Sauerstoffs an den Atmungskatalysator verhindert wird, sondern in gleicher Weise die Bindung des Sauerstoffs an den Gärungskatalysator.

Entsprechend wäre auch die Wirkung des Blausäureäthylesters und des Kohlenoxyds auf das Verhältnis von Atmung und Gärung in zahlreichen Körperzellen und Bakterien¹ zu deuten. Kohlenoxyd würde, ähnlich wie Blausäure, durch Verdrängung des Sauerstoffs sowohl vom Atmungsferment wie vom Gärungsferment wirken, Blausäureäthylester, indem er lediglich mit dem Gärungsferment reagiert.

Atmung und Glykolyse sind keine direkt gekoppelten Reaktionen und verlaufen nur in mittelbarer Abhängigkeit voneinander. Jede der beiden Stoffwechselreaktionen kann für sich allein beeinflusst werden: Die Atmung durch niedrigen Sauerstoffdruck, die Gärung durch Blausäureäthylester. Blausäure und Kohlenoxyd wirken, indem sie sich in gleichem Maße mit dem Atmungsferment wie mit dem Gärungsferment verbinden.

Experimentelles.

Als Versuchsmaterial wurden kernhaltige Blutzellen verwendet. (Bei Gewebsschnitten ist, wenn eine Abhängigkeit der Atmung vom Sauerstoffdruck gefunden wird wie bei Krebszellen, der Fehler ungenügender Diffusion auch bei optimaler Grenzschnittstärke nicht mit Sicherheit auszuschließen². Die Atmung von Pneumococcen, die sich sehr empfindlich gegen Änderungen des Sauerstoffdruckes zeigte³, wird durch Blausäure nicht gehemmt⁴.)

Blut von einem 9 Monate alten Gänserich wurde aus der Flügelvene steril in Heparin entnommen (20 mg Heparin in 80 ccm Blut), 10 Minuten mit Glaskugeln vorsichtig geschüttelt, durch Gaze filtriert und im Standzylinder mit 5% CO₂/Luft gesättigt. Der Stoffwechsel der Blutzellen blieb, wenn sie bei 0° C aufbewahrt wurden, 2 Tage lang unverändert, so daß alle Vergleichsversuche an der gleichen Blutprobe ausgeführt werden konnten. Die Gassättigungen in den Manometergefäßen geschahen mit über Quecksilber (2 Liter) hergestellten Gasgemischen, die bei den Sauerstoffdruckversuchen geringe CO-Mengen ($p_{CO}/p_{O_2} = 0,1$) zur Austreibung des Sauerstoffs aus dem Hämoglobin enthielten⁵. Das Manometergefäßpaar I wurde während aller Sättigungen im Thermostaten geschüttelt. Die Schüttelgeschwindigkeit war 180 Schwingungen pro Minute. Steigerung der Schüttelgeschwindigkeit ergab keine Veränderung der Resultate. Die Stoffwechselmessungen sowie die Bestimmung der Kohlensäure- und Milchsäureretention wurde nach den von Warburg angegebenen Methoden⁶ ausgeführt. Das Gewicht der Blutzellen wurde nach Peschel⁶ bestimmt. In einer Reihe von Versuchen wurde das Blut mit Ringer-Bicarbonat-Glucose verdünnt, doch nimmt bei größeren Verdünnungen der Sauerstoffeffekt auf die Atmung ab. Ein typischer Versuch ist im Protokoll wiedergegeben.

¹ O. Warburg, Katalytische Wirkungen, Berlin 1928. — ² R. Lohmann, Klin. Wochenschr. 39, 1199, 1931. — ³ C. Schlayer, J. of Bact. 81, 181, 1936. — ⁴ M. Sevag, diese Zeitschr. 267, 211, 1933. — ⁵ O. Warburg, F. Kubowitz u. W. Christian, ebenda 242, 149, 1931. — ⁶ E. Peschel, Klin. Wochenschr. 23, 1061, 1930.

Einfluß des Sauerstoffdrucks auf den Zellstoffwechsel usw. 97

Protokoll.

Das Versuchstier war infolge vorangegangener Blutentnahmen anämisch. Das Blut in I und III enthielt 40 mg Zellen pro cem. Das Blut in II enthielt 38 mg Zellen, 0,05 cem m/100 KCN pro cem. 37,8° C. $\tau = 0,0725$.

| | Gefäßpaar I aerob | | Gefäßpaar II aerob 5 · 10 ⁻⁴ mol. KCN | | III anaerob |
|--|---|---|---|--|---|
| | mm H | mm (3/6 b) | mm H | mm (2/6 b) | mm (3/6 b) |
| Hauptraum (cem Blut) | 6,0 | 3,0 | 228 cem in 197,4 mg | 92 cem in 80,5 mg | 121 cem in 106,3 mg |
| Anhangsblut: cem Milchsäure gelöst in mg Wasser | — | — | $v_f = 6,20$ $v_g = 11,64$ | $v_f = 2,08$ $v_g = 16,92$ | $v_f = 3,11$ $v_g = 15,89$ |
| Volumina in cem | $v_f = 6,00$ $v_g = 11,64$ | $v_f = 3,00$ $v_g = 14,52$ | $v_f = 6,20$ $v_g = 11,44$ | $v_f = 2,08$ $v_g = 16,92$ | $v_f = 3,11$ $v_g = 15,89$ |
| Gefäßkonstanten in qmm | $K_{O_2} = 1,038$ $K_{CO_2}^W = 1,353$ $K_{CO_2}^{BL} = 1,788$ | $K_{O_2} = 1,284$ $K_{CO_2}^W = 1,45$ $K_{CO_2}^{BL} = 1,668$ | $K_{O_2} = 1,021$ $K_{CO_2}^W = 1,35$ $K_{CO_2}^{BL} = 1,785$ $K_M = 2,60$ | $K_{O_2} = 1,492$ $K_{CO_2}^W = 1,602$ $K_{CO_2}^{BL} = 1,747$ $K_M = 2,59$ | $K_N = 2,88$ |
| | mm H | mm (3/6 b) | mm H | mm (2/6 b) | mm (3/6 b) |
| Gastrum I | 5 Vol.- $\frac{O_2}{10}$ CO ₂ 1,93 Vol.- $\frac{O_2}{10}$ CO 19,3 Vol.- $\frac{O_2}{10}$ O ₂ /N ₂ | — 5,5 — 5,5 — 5,0 — 6,0 | 10' — 1,5 10 — 2,5 10 — 1,5 | + 2,0 + 2,5 + 2,0 | 5 Vol.- $\frac{O_2}{10}$ CO ₂ /CO + 6,0 + 6,5 + 5,5 |
| Gastrum II | 5 Vol.- $\frac{O_2}{10}$ CO ₂ 0,61 Vol.- $\frac{O_2}{10}$ CO 16,1 Vol.- $\frac{O_2}{10}$ O ₂ /N ₂ | — 4,0 — 4,0 — 4,0 — 9,5 | 10' + 85 10 — 2,5 mm Milchsäure = a: + 87 | + 37,5 + 2,0 + 35,5 | + 47,5 + 5,5 + 42 |
| Gastrum III | 5 Vol.- $\frac{O_2}{10}$ CO ₂ 1,93 Vol.- $\frac{O_2}{10}$ CO 19,3 Vol.- $\frac{O_2}{10}$ O ₂ /N ₂ | — 4,5 — 16,5 — 16,0 | | | |

Protokoll (Fortsetzung).

98

| | | | | |
|---|---------------------------|---|--------------------|--------------------|
| Berechnung des Stoffwechsels aus den H - und h -Werten (15'-Ablesungen) des Gefäßpaares I nach Warburg, „Stoffwechsel der Tumoren“, S. 213, Formel (22) und (23). | | Berechnung des Stoffwechsels in Blausäure aus H - und h -Werten (30'-Ablesungen) des Gefäßpaares II nach Warburg, diese Zeitschr. 242, 180, Formel (3) und (4). | | $X_M^{CO} = 104$ |
| $H_I = -57,5$ | $h_I = -23$ | $H = -5,5$ | $h = +19,5$ | $Q_M^{CO} = 0,864$ |
| $H_{II} = -30$ | $h_{II} = -24$ | $X_{O_2} = 77,8$ | $Q_{O_2} = 0,683$ | |
| $H_{III} = -49,5$ | $h_{III} = -25$ | $X_M = 70,4$ | $Q_{MO_2} = 0,617$ | |
| $X_{O_2}^I = -110,6$ | $X_{CO_2}^I = +91,8$ | | | |
| $X_{O_2}^{II} = -31,99$ | $X_{CO_2}^{II} = +1,6$ | | | |
| $X_{O_2}^{III} = -106,84$ | $X_{CO_2}^{III} = +99,38$ | | | |

| | | | |
|------------------|--|--|------|
| Vol.-% O_2 | Q_{O_2} (Sauerstoffverbrauch von 1 mg Zellen in 1 Std.) | Q_{CO_2} (Kohlensäurebildung von 1 mg Zellen in 1 Std.) | RQ. |
| (I) 19,3 | 1,77 | 1,53 | 0,87 |
| (II) 6,1 | 0,53 | 0,03 | 0,06 |
| (III) 19,3 | 1,81 | 1,66 | 0,92 |

| | | | |
|---|------|---|------|
| Hemmung des Sauerstoffverbrauchs bei 6,1 Vol.-% O_2 | 70 % | Hemmung der Kohlensäurebildung bei 6,1 Vol.-% O_2 | 96 % |
|---|------|---|------|

| | |
|--|---|
| $Q_M^{O_2}$ (Milchsäurebildung von 1 mg Zellen in 1 Std. für 6,1 und 19,3 Vol.-% O_2 , chemisch * bestimmt) | Q_M^{CO} (anaerobe Milchsäurebildung von 1 mg Zellen in 1 Std., chemisch * bestimmt) |
| 0 | 0,868 |

C. Schlayer.

* 6 ccm Blut wurden in Manometergefäßen bei konstant gehaltenem O_2 -Druck im Thermostaten geschüttelt und die Milchsäure zur Zeit t_0 und nach 120 Minuten nach *Fuerth-Charnack-Clausen* in der Modifikation von *Friedemann*¹ bestimmt.

¹ J. Biol. Chem. 73, 335, 1927; ebenda 82, 23, 1929; ebenda 100, 291, 1933.

Effect of Oxygen Tension on Cellular Metabolism

Kempner, Walter

1937. The effect of oxygen tension on cellular metabolism

J. Cell. and Comp. Physiol., v. 10, no. 3, Oct. 20

| | | |
|------------|-------------------|---------|
| Physiology | { metabolism | Animals |
| | { blood and lymph | Plants |

Metabolism, cellular—effect of oxygen tension

THE WISTAR INSTITUTE PRESS
Philadelphia, Pa., U.S.A.

Reprinted from the JOURNAL OF CELLULAR AND COMPARATIVE PHYSIOLOGY
Vol. 10, No. 3, October, 1937

EFFECT OF OXYGEN TENSION ON CELLULAR METABOLISM

WALTER KEMPNER

*Departments of Medicine and Physiology, Duke University School of Medicine,
Durham, North Carolina*

FOUR FIGURES

A. DECREASE OF OXYGEN TENSION IN TISSUE FLUIDS UNDER PATHOLOGICAL CONDITIONS

The oxygen tension at the surface of the human or animal cell is determined by an equilibrium which results from the oxygen consumption of the respiring cell and from the oxygen supply to the tissue fluid surrounding the cell. The oxygen tension of the tissue fluid depends on the oxygen tension of the atmosphere, on the degree of saturation with oxygen of the blood in the lungs and on the amount of blood circulating between the lungs and the tissue. The oxygen tension in the tissue fluids must be low as compared with that in the lung alveoli, since the saturation of venous blood is around 30 to 60 mm. Hg when atmospheric tension is 160 mm. Hg. When the atmospheric tension drops below 160 mm. Hg, or if there is any disturbance of the mechanism of oxygen supply, the oxygen tension of the tissue fluids will fall unless the body is able to compensate a deficiency in one respect by a surplus in another, as, for instance, by increasing the number of red blood cells and the amount of circulating blood at lower atmospheric tensions. However, if the body fails to compensate for the deficiency, pathological conditions will ensue. There are many diseases in which various kinds of injuries to various parts of the body cause disturbances of oxygen supply to the tissue fluid of one or many organs, e.g., mountain sickness, coronary

occlusion, embolic and inflammatory processes, marked anemias, Raynaud's disease and so on. The primary phenomenon in these various diseases is always the same: lack of oxygen, and a consequent fall in the oxygen tension at the surface of the cell. The clinical symptoms vary according to the function of the cells affected.

In previous experiments it has been tried to determine the actual oxygen tension in pathological tissue fluids (Kempner and Peschel, '30). The amount of oxygen contained in human exudates was measured manometrically by combustion in a hydrogen atmosphere. The average oxygen tension in sterile blisters of the skin, after inflammatory periods of 3 days, was thus found to be 22 mm. Hg. The lowest oxygen tension found in this series of experiments was 6 mm. Hg, that is, 0.8 vol. % O_2 at the site of the lesion as contrasted with the normal 20 vol. % O_2 in the inspired air.

This paper deals with the question: How do these pathological 'lows' in oxygen tension affect the vital reactions of animal cells and bacteria as regards their respiration, respiratory quotient, splitting metabolism and growth?

B. PREVIOUS DATA ON THE EFFECT OF LOW OXYGEN TENSION UPON CELLULAR METABOLISM

The earlier experiments on this subject were criticized by Warburg ('14, '26 a) who showed that they had been vitiated by a fundamental error in technique. This error lay in the assumption that the rate of diffusion of oxygen through bacterial suspensions and tissue slices of varying thickness, was invariably sufficient to maintain a constant oxygen tension at the surface of each of the cells whose metabolism was being measured. The fact was disregarded that whenever the diffusion rate is less than the rate of oxygen consumption, the oxygen tension at the surface of the more remote cells may easily drop to zero, and in these areas of complete anaerobiosis the oxygen consumption will necessarily cease altogether. Thus measurements made under conditions in which the cells being examined are not actually in equilibrium with a definite

oxygen tension, concern the limiting factor of the diffusion rate through the suspension media surrounding the cell rather than any biological phenomenon in the cell itself.

Warburg, who developed most of the methods of measuring cellular metabolism, was the first to investigate the effect of oxygen tension on cellular respiration under conditions of optimal gas diffusion. He determined the respiration of sea urchin eggs at 20°C., and found that the oxygen consumption was the same at oxygen tensions of 33 mm. Hg (4.35 vol. % O₂) and at 132 mm. Hg (17.4 vol. % O₂) (Warburg, '08). Similarly the rate of oxidation of nucleated red blood cells of geese, which he examined at 0°C., proved to be unchanged at oxygen tensions varying between 5 and 75 mm. Hg (0.7 and 10.0 vol. % O₂) (Warburg, '14). With *Micrococcus candicans* examined at 1°C. the rate of respiration, even at an oxygen tension of 10⁻⁵ atm. (0.0076 mm. Hg = 0.001 vol. % O₂), was the same as in air (Warburg and Kubowitz, '31). Also in erythrocytes of rabbits, poisoned by phenylhydrazin, the respiration examined at 38°C. was the same at 5 vol. % O₂ and at 20 vol. % O₂ (Warburg, Kubowitz and Christian, '31). Since the publication of these experiments it has been a generally accepted axiom that cellular respiration is independent of variations of oxygen tension. Oppenheimer, e.g., writes on this problem in 'Die Fermente' ('25): "All observers agree that there is no true connection between the real oxygen tension with which the cell is actually put into equilibrium and the extent of respiration. Gross errors may occur when only the surface of the liquid, or of the tissue suspension, are in equilibrium with the oxygen and not the individual cells." Meyerhof ('30), discussing the calculation of the amount of oxygen necessary for the supply of the isolated muscle, writes: "In the given formulae it is assumed that the rate of respiration of cells is independent of oxygen tension. This assumption corresponds to the general experience of the respiration of animal organs."

Recently Bumm, Appel and Fehrenbach ('34) have studied again the problem of the effect of oxygen tension on cellular

respiration and glycolysis. Their experimental material was the mucous membrane of guinea pig intestine. They examined the respiration in sodium chloride phosphate solution, and the aerobic lactic acid fermentation in Ringer-bicarbonate at 10 vol. per cent and in pure oxygen. They found the rate of respiration unchanged, whereas the aerobic lactic acid formation increased with lowered oxygen tension.

Leiner¹ ('35) objected to these experiments, arguing that Bumm and his co-workers had used different suspension media for measuring respiration and glycolysis, and that in working with tissue slices the apparent effect of low oxygen tensions on glycolysis may have arisen because of insufficient oxygen diffusion. Examining red blood cells of rabbits poisoned with phenylhydrazin, Leiner found no difference, either in the respiration or in the aerobic glycolysis, between oxygen tensions of 6 vol. per cent and 100 vol. per cent.

Exceptions have, however, been found to this 'all or nothing law' of cellular respiration. But in most of these, e.g., paramecium and *Arbacia* eggs (Lund, '18; Amberson, '28; Tang, '31; Tang and Gerard, '32), yeast cells (Warburg, '26 b; Iwasaki, '30), luminous bacteria (Shoup, '29), *Sarcina lutea* (Gerard and Falk, '31), *Chlorella* (Tang and French, '33), the effect of lowered oxygen tension on respiration became evident only at oxygen tensions below 1 vol. per cent, and it could not be decided how much of the inhibition was due to the oxygen tension as such and how much to insufficient oxygen diffusion (Gerard, '31).

The only cells which showed a marked decrease of respiration, even at relatively high oxygen tensions, were the nitrifying bacteria (Meyerhof and Burk, '28; Burk, '30; Iwasaki, '30; Meyerhof and Schulz, '32), sarcoma cells (Lohmann, '31) and pneumococcus (Schlayer, '36). The relative rate of respiration of *Azotobacter* at 2 vol. % O_2 and in air was 1:2 and that of pneumococcus at 2 vol. % O_2 and in air even 1:4.5. The rate of respiration of sarcoma slices at oxygen tensions of 23 mm. Hg = 3 vol. % O_2 , was inhibited 60 to 75% as compared with the rate of respiration in pure oxygen. In the

¹ Warburg Institute.

discussion of this result, however, Lohmann quotes the crucial experiment with *Micrococcus candicans*, the respiration of which Warburg found to be unchanged even at oxygen tensions of 10^{-5} atm., and specifically points out that under conditions of lowered oxygen tensions in tissue slices even of 'optimal limiting thickness' the error of insufficient oxygen diffusion to the surface of the cells cannot be excluded with certainty.

C. EXPERIMENTS ON THE EFFECT OF LOWERED OXYGEN TENSIONS ON CELLULAR METABOLISM

To exclude errors due to insufficient diffusion of oxygen to the cell surface, only isolated cells were used: human erythroblasts, lymphatic and myeloid leucocytes, red blood cells of birds and cold-blooded animals, *Micrococcus candicans*, *Staphylococcus aureus*, *pneumococcus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas pyocyanea*, *Monilia albicans*. The measurements were made in the usual way, determining respiration, CO_2 formation and total acid formation manometrically by the methods of Warburg ('26 a; Warburg, Kubowitz and Christian, '31), and lactic acid formation chemically according to Fuerth, Charnas and Clausen (Friedemann, Cotonio and Schaffer, '27; Friedemann and Kendall, '29; Friedemann and Graeser, '33). The difference in procedure from previous experiments consisted only in this: that more care than usual was taken to work under conditions approaching as nearly as possible those in vivo, e.g., the respiration of bird erythrocytes was measured not at 0°C . but at 40°C ., not in salt solution but in plasma, not in the absence of CO_2 but at a normal CO_2 concentration. It was found that under physiological conditions the respiration of all the cell types mentioned above is largely dependent on variations of oxygen tension. But under unfavorable conditions the entire phenomenon easily may escape observation, since the effect of oxygen tension on respiration is markedly altered by changes in pH, carbon dioxide concentration, salt content and temperature (Kempner, '36 a).

1. *Effect of variations of oxygen tension on the metabolism of nucleated red blood cells of birds and cold-blooded animals*

The blood of normal and anemic geese, of ducks, chickens and turkeys was taken under sterile conditions in heparin (5 mg. in 20 cc.) from the wing vein, without contamination with tissue fluid. The blood of alligators and bullfrogs was taken by heart puncture.

In the typical experiment described here, blood of an anemic gander was used. The blood was gently shaken with glass beads for 5 minutes and filtered through gauze. It was pipetted into four Warburg manometer vessels of about 18 cc. capacity, which were closed with valve stoppers so that it was possible to saturate them with different gas mixtures while they were being shaken in the thermostat. The gas mixtures were prepared in a mercury cylinder of 2 liters capacity. They contained carbon monoxide ($\frac{p_{CO}}{p_{O_2}} = 0.13$),² so that the oxygen of the hemoglobin was almost completely displaced by carbon monoxide (Warburg, '29). Vessel 1 (4 cc. of blood) and vessel 2 (2 cc.) were saturated for 10 minutes with a gas mixture containing 5% CO₂-2.5% CO-19.3% O₂/in N₂. Vessel 3 (4 cc.) containing 0.2 cc. of 10% sodium hydroxide in the side bulb to absorb carbon dioxide, was saturated with 2.5% CO-19.3% O₂/in N₂. Vessel 4 was saturated with 5% CO₂/in CO in order to produce anaerobic conditions. The dry weight of the cells in 4 cc. of blood was 237 mg., the temperature was 40°C. and the shaking speed was 165 oscillations a minute.

² The variation of respiration with oxygen tension was found in blood which was saturated with gas mixtures not containing any carbon monoxide. It is, however, advisable to use a small percentage of CO to facilitate the saturation with the low oxygen tension gas mixture (Warburg, Kubowitz and Christian, '31) and to eliminate possible errors due to the respiring cells consuming oxygen, dissociated from the hemoglobin with the otherwise negligible drop of oxygen tension in the manometer vessels during the time of the experiment. That CO even at much higher concentration does not inhibit the respiration of bird erythroblasts was shown by Warburg ('27). This has been repeated ($\frac{p_{CO}}{p_{O_2}} = 8.5$, i.e., sixty-five times as great as used in the saturations above) and extended to the erythroblasts of alligators and of a patient with erythroblastic anemia, with the same result.

OXYGEN TENSION AND CELLULAR METABOLISM

345

(Increase of the shaking speed to 210 oscillations a minute did not alter the results.) The readings were made every 5 minutes without stopping the manometers.

In vessels 1, 2 and 3 the metabolism was determined at 19.3% O₂ over a period of 30 minutes. Then the vessels while shaking in the thermostat were saturated with gas mixtures containing 3.8% O₂, and CO in the same ratio as before (0.5% CO-3.8% O₂-5% CO₂/in N₂ and 0.5% CO-3.8% O₂/in N₂). The saturation time was 10 minutes. After another 20 to 30 minutes the vessels were resaturated with the original gas mixtures of 19.3% O₂. The retention of carbon dioxide and lactic acid was determined according to Warburg (Warburg, Kubowitz and Christian, '31). (For calculation of metabolism figures compare C. 3).

TABLE 1
Metabolism of 100 mg. blood cells of anemic goose in 1 hour at various oxygen tensions (40°C.)

| VOL. % O ₂ | IN ALKALINE CARBON DIOXIDE FREE MEDIUM | IN UNCHANGED PHYSIOLOGICAL MEDIUM WITH 5 VOL. % CO ₂ | |
|-----------------------|--|--|---|
| | Cu.mm. oxygen consumed | | Cu.mm. lactic acid formed (1 cu.mm. = 0.004 mg.) |
| 19.3 | 101 | 106 | 16 |
| 3.8 | 96 | 44 | 0 |
| 0 | | | 190 |

Table 1 shows that at 19.3 vol. % O₂ there is only a very small difference in the absolute respiration values between the blood cells examined at normal pH and a physiological CO₂ tension, and the same cells examined at alkaline pH in the absence of CO₂. In the physiological medium, however, decrease of oxygen tension causes a great decrease in respiration, which is completely reversible if the cells are not kept under low oxygen pressure too long; whereas in the alkaline carbon dioxide free medium the respiration rate remains nearly unchanged. The fact that respiration varies with oxygen tension in the neutral medium and does not in the alkaline medium proves that the decrease of respiration at low oxygen tensions is not due to insufficient diffusion of

oxygen from the gas space or the suspension medium into the cells, since all the conditions which might influence the diffusion (cell volume, oxygen tension, shaking speed) are identical in both media. That the rate of respiration actually depends on the oxygen tension and that the decrease in respiration is not caused by the presence of anaerobic areas due to insufficient oxygen diffusion, is also proved by the fact that no increase of lactic acid formation is found, either manometrically or chemically, under these conditions of lowered oxygen tension. In the complete absence of oxygen a great amount of lactic acid is formed by erythroblasts of geese. At an oxygen tension of 3.8 vol. per cent no lactic acid was found in spite of a 60% decrease in respiration. The ratio $\frac{\text{anaerobic glycolysis} - \text{aerobic glycolysis}}{\text{respiration}}$ (Meyerhof quotient) is 1.6 at 19.3 vol. per cent oxygen and 4.0 at 3.8 vol. per cent oxygen.

2. Mechanism of the Pasteur reaction

The fact that lactic acid formation, which should be expected with the decrease of respiration, does not take place, is significant for the mechanism of the so-called Pasteur reaction, i.e., the disappearing of lactic acid formation in the presence of oxygen. It shows that respiration and glycolysis in the nucleated blood cells are not combined reactions in the sense that glycolysis starts when respiration ceases, as was apparently proved in many cells by the ideal shift from respiration to glycolysis at an oxygen tension of zero and under the influence of carbon monoxide and cyanide. But there are oxygen tensions too low for optimal respiration and too high for 'anaerobic' fermentation, and instead of assuming like Meyerhof ('30), a mathematical relationship between respiration and glycolysis, the conclusion seems justified that the rate of glycolysis, as well as the rate of respiration, depends directly on oxygen tension.

Table 2 shows the lactic acid content of blood, kept for 2 hours under constant gas pressure of various oxygen tensions. Rectangular manometer vessels of about 18 cc. capacity, num-

OXYGEN TENSION AND CELLULAR METABOLISM

347

bered 1 to 5 and containing 6 cc. of blood each, were simultaneously placed in the thermostat (37.8°C.) and saturated with a gas mixture of 5% CO₂-2.5% CO-19.3% O₂/in N₂. After a shaking period of 30 minutes 3 cc. of the blood contained in vessel 1 was precipitated with trichloroacetic acid. Exactly at the same time vessel 3 was saturated with 5%

TABLE 2

Lactic acid formed at various oxygen tensions in 2 hours by 100 cc. goose blood containing 31 cc. blood cells (37.8°C.)

| AT THE BEGINNING OF THE EXPERIMENT | AFTER SHAKING BLOOD FOR 2 HOURS | | | | |
|------------------------------------|---------------------------------|------|------|------|--|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
| 18.8 | 18.8 | 3.8 | 1.6 | 0 | per cent oxygen |
| 32.0 | 34.4 | 33.9 | 37.5 | 52.4 | mg. lactic acid contained in 100 cc. blood |
| 0 | 2.4 | 1.9 | 5.5 | 20.4 | mg. lactic acid formed by 100 cc. blood |

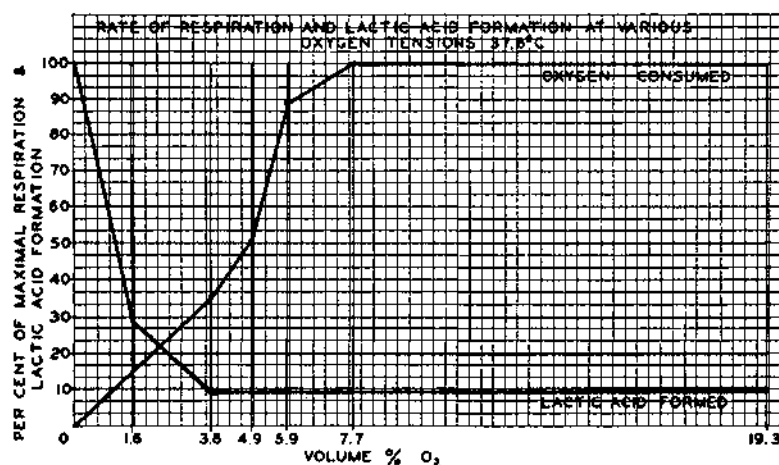


Figure 1

CO₂-0.5% CO-3.8% O₂/in N₂; vessel 4 with 5% CO₂-0.21% CO-1.6% O₂/in N₂ and vessel 5 with 5% CO₂/in CO. These four vessels, containing oxygen concentrations of 19.3%, 3.8%, 1.6% and 0%, respectively, were shaken for 2 hours, the oxygen tension being kept constant by resaturating every

20 minutes. After 2 hours 3 cc. of the contents of each manometer vessel were precipitated with trichloroacetic acid, and the lactic acid, distilled as acetaldehyde, was determined. While the four vessels for the chemical lactic acid determination were shaken in the thermostat, respiration and total acid formation at oxygen tensions of 19.3, 7.7, 5.9, 4.9 and 3.8 vol. per cent were measured manometrically in vessels 6 and 7, containing 6 cc. and 3 cc. of the same blood sample.

Figure 1 shows the decrease in respiration and the increase in lactic acid formation at lowered oxygen tensions. It is evident that in erythroblasts the glycolysis-oxygen tension curve is not the reciprocal of the respiration-oxygen tension curve, but is entirely different in shape.

3. Calculation of metabolism figures

If, employing the usual terms (Warburg, 26 a), we call the differences of gas pressure in vessels 6 and 7, calculated for the same weight of cells, H and h , the constants for oxygen, carbon dioxide and lactic acid KO_2 , KCO_2 , KM , and kO_2 , kCO_2 , kM , the amounts of oxygen consumed and carbon dioxide formed in respiration xO_2 and xCO_2 , and the amount of carbon dioxide formed in lactic acid fermentation xM , we have the two equations:

$$H = \frac{xO_2}{KO_2} + \frac{xCO_2}{KCO_2} + \frac{xM}{KM} \quad (1)$$

$$h = \frac{xO_2}{kO_2} + \frac{xCO_2}{kCO_2} + \frac{xM}{kM} \quad (2)$$

with the three unknowns xO_2 , xCO_2 , xM . For most determinations of cellular metabolism it is probably sufficient to assume a respiratory quotient of unity, and to calculate the metabolic figures on this assumption. But since it was possible that with lowered oxygen tension and decreasing respiration the respiratory quotient might change, xM had to be determined directly as lactic acid. (Measuring the splitting metabolism by determining the decrease in sugar content of

OXYGEN TENSION AND CELLULAR METABOLISM

349

the blood, led practically to the same results, but for exact calculation it cannot be substituted for direct lactic acid determination, since some of the sugar may have been consumed by respiration. The method of measuring the splitting metabolism by determining the decrease of bicarbonate proved not to be accurate enough.) If xM is determined chemically in a separate experiment, as described above, we can simply solve equations (1) and (2) for xO_2 and xCO_2 and obtain the actual respiratory quotient.

4. *The effect of lowered oxygen tension on the respiratory quotient*

Table 3 shows the results of an experiment with goose erythroblasts, in which, as described in C2, the respiration and total acid formation were measured manometrically, while the lactic acid formed at the same time was determined chemically. The metabolism figures were calculated according to C3.

TABLE 3

Effect of lowered oxygen tensions on the respiratory quotient. Respiration of 100 mg. goose erythroblasts in 1 hour (37.8°C.)

| VOL. % O_2 | xO_2 CU.MM. OXYGEN CONSUMED | xCO_2 CU.MM. CARBON DIOXIDE FORMED IN RESPIRATION | $\frac{xCO_2}{xO_2}$ RESPIRATORY QUOTIENT |
|--------------|----------------------------------|---|--|
| 19.3 | 65 | 58.5 | 0.9 |
| 7.7 | 65 | 58.5 | 0.9 |
| 5.9 | 57.5 | 49.7 | 0.865 |
| 4.9 | 33.2 | 6.7 | 0.202 |
| 3.8 | 22.8 | 0.59 | 0.026 |

At an oxygen tension of 4.9% we find not only a marked decrease in the absolute rate of respiration, but also a definite decrease in the respiratory quotient. This means that at lowered oxygen tensions cell respiration is not only quantitatively decreased but also qualitatively altered. The amount of carbon dioxide formed no longer corresponds to the amount of oxygen consumed, a very incomplete oxidation taking place.

5. *Influence of physical and chemical changes in the cell environment upon the effect of oxygen tension on respiration*

The effect of oxygen tension on cell respiration is largely dependent on variations in temperature. At 26°C. the effect of oxygen tension is still very marked. At 10°C. there is no difference in the rate of respiration of erythroblasts of geese and alligators examined at oxygen tensions of 3.8 and 19.3 vol. per cent.

The effect of oxygen tension on respiration is greatest in cells which have not been injured by cooling, lack of oxygen, centrifuging and substitution of salt solutions for the plasma. However, if it is necessary to substitute salt solutions for the plasma, blood cells of geese with marked anemia are the most suitable material. Blood cells of turkeys, chickens and alligators are less resistant and change their metabolism easily, as shown by the appearance of aerobic glycolysis, which is never found if they are examined in their own plasma with the usual precautions. It is also inadvisable to dilute the blood to more than twice its volume with plasma or bicarbonate-Ringer solutions, since with greater dilutions, even with plasma, the sensitivity of respiration to variations of oxygen tension is markedly decreased.

The sensitivity of respiration of red blood cells to variations of oxygen tension decreases very markedly if a phosphate buffer of the same pH is substituted for the bicarbonate-carbon dioxide buffer, the concentration of the phosphate not being important. Phosphate concentrations between 1/15 and 1/100 mol. have been used, but in all phosphate media compared with bicarbonate-carbon dioxide media, the same difference in the sensitivity of the respiration to oxygen tension has been found.

Table 4 shows that in sodium chloride-glucose-m/60 phosphate (pH=7.4) at an oxygen tension as low as 0.8 vol. per cent, the respiration is not inhibited at all; in Ringer-bicarbonate-glucose the same blood cells showed an inhibition of 60% at 3.8 vol. % O₂.

OXYGEN TENSION AND CELLULAR METABOLISM

351

TABLE 4

Respiration of 100 mg. goose erythroblasts at various oxygen tensions (37.8°C.). Plasma substituted by 0.9% NaCl-0.2% glucose-m/60 phosphate (pH = 7.4) and Ringer-bicarbonate-0.2% glucose-5%CO₂ (pH = 7.4), respectively; 4 cc. blood cells in 10 cc. suspension

| VOL. % O ₂ | PHOSPHATE | BICARBONATE—5% CO ₂ |
|-----------------------|---------------------------------|--------------------------------|
| | cu.mm. oxygen consumed per hour | |
| 19.3 | 52 | 66 |
| 3.8 | 52 | 26 |
| 0.8 | 52 | |

The insensitivity of respiration to variations of oxygen tension in phosphate solutions is similar to the behavior of the respiration of many animal cells to carbon monoxide (Dixon and Elliot, '29). While CO ($\frac{p_{CO}}{p_{O_2}} = 18$) inhibits the respiration, e.g., of phenylhydrazin erythrocytes in Ringer-bicarbonate by 67%, the same cells in sodium chloride-phosphate do not show any inhibition by the same CO concentration (Warburg, Kubowitz and Christian, '31).

6. Experiments with human erythroblasts and leukemic blood cells

Blood of a patient with erythroblastic anemia containing a large number of nucleated red blood cells and the blood of patients with lymphatic and myeloid leukemia showed essentially the same variation of respiration with oxygen tension. Blood samples were taken from the cubital vein in heparin (5 mg. heparin in 20 cc. erythroblastic blood, 25 mg. heparin in 20 cc. leukemic blood) and shaken gently with glass beads at 37.5°C. in 5% CO₂/in air for 5 minutes; then filtered through gauze and pipetted into manometer vessels of about 18 cc. capacity, which contained 0.2 cc. m/40 lactic acid in the side bulbs, for the determination of the lactic acid retention. Ten minutes after the blood was taken, all the manometer vessels were saturated with gas simultaneously while being shaken in the thermostat. The gas mixtures were 19.3% O₂-2.5% CO-5% CO₂/in N₂ (I), 4.8% O₂-0.63% CO-5% CO₂/

in N_2 (II), and 5% CO_2 /in CO . The metabolism under aerobic conditions was measured for periods of 25 minutes successively at 19.3% O_2 (I), 4.8% O_2 (II), and again at 19.3% O_2 (I).

Table 5 gives the result of the experiment. The respiration of human erythroblasts is very sensitive to changes of oxygen tension. At an oxygen tension no lower than 4.8 vol. per cent the respiration is inhibited by 57%, as compared with the respiration at 19.3 vol. per cent oxygen.

Like the leucocytes of human exudates (Kempner and Peschel, '30), human nucleated red blood cells show not only a high respiratory metabolism but at the same time a high

TABLE 5

Metabolism of 100 mg. blood cells of a patient with erythroblastic anemia at various oxygen tensions. 10 cc. blood contained 3.3 cc. blood cells. 7% erythroblasts.

Sugar content: 82 mg./100 cc. blood. Bicarbonate content:

546 cu.mm./1 cc. 5% carbon dioxide. Temperature 37.5°C.

| VOL. % O_2 | CU.MM. OXYGEN CONSUMED PER HOUR | CU.MM. LACTIC ACID FORMED PER HOUR (CU.MM. = 0.004 MG.) |
|--------------|---------------------------------|---|
| 19.3 | 94 | 217 |
| 4.8 | 40 | 183 |
| 0 | | 408 |

rate of glycolysis, even under aerobic conditions (Kempner, '36 b). In spite of the great decrease in the respiratory metabolism at 4.8 vol. per cent oxygen no increase in the rate of glycolysis was found.

Table 6 gives the results of an experiment with the blood of a patient with myelogenous leukemia. The blood was shaken in the thermostat until so much sugar was consumed that, judging from the manometric pressures, glycolysis in air had almost ceased (the anaerobic glycolysis had decreased 80% by this time). In undiluted blood with a normal sugar content and a large number of myeloid leukocytes, this process requires about 40 to 60 minutes. After that time oxygen consumption and carbon dioxide formation was measured in three 25-minute periods at 19.3% and 5.2% O_2 .

OXYGEN TENSION AND CELLULAR METABOLISM

353

TABLE 6

Effect of variations of oxygen tension on the metabolism of 100 mg. blood cells of a patient with myelogenous leukemia. In 10 cc. blood 4.8 cc. blood cells. 4.495000 erythrocytes, 174,000 white blood cells in 1 cu.mm. Sugar content: 18 mg./100 cc. blood (37.5°C.)

| VOL. % O ₂ | CU.MM. OXYGEN CONSUMED | CU.MM. CARBON DIOXIDE FORMED IN RESPIRATION AND FERMENTATION | CU.MM. CO ₂ FORMED CU.MM. O ₂ CONSUMED |
|-----------------------|------------------------|--|---|
| 19.3 | 70.7 | 79.7 | 1.13 |
| 5.2 | 24.9 | 18.9 | 0.76 |
| 19.3 | 68.2 | 76.0 | 1.11 |

If we assume a respiratory quotient of 0.9 for the leukemic blood cells at 19 vol. per cent oxygen and no difference in the amount of carbon dioxide formed in lactic acid fermentation at 19 vol. per cent and at 5.2 vol. per cent oxygen, the calculation yields a respiratory quotient of 0.4 at an oxygen tension of 5.2%. That would mean that in human white blood cells, as shown for nucleated red blood cells, not only the rate of respiration but also the respiratory quotient is considerably decreased with lowered oxygen tension.

TABLE 7

Effect of variations of oxygen tension on the respiration of 100 mg. blood cells of two patients with lymphatic leukemia. Patient I: 13,000 leukocytes, 4.300000 erythrocytes/in 1 cu.mm. blood. Patient II: 87,000 leukocytes, 2.430000 erythrocytes/in 1 cu.mm. blood. 37.5°C.

| VOL. % O ₂ | BLOOD I | BLOOD II |
|-----------------------|--|----------|
| | <i>cu.mm. oxygen consumed per hour</i> | |
| 18.8 | 6 | 64.7 |
| 3.8 | 6 | 24.2 |

Table 7 shows the effect of variations of oxygen tension on the metabolism of 100 mg. blood cells of two patients with lymphatic leukemia, one in an aleukemic state (I), the other with a high leukocytosis (II). While in blood II, with a large number of immature white blood cells besides the normal non-nucleated erythrocytes, there was a marked difference in the metabolism at 3.8 vol. per cent oxygen and in air, blood I, containing besides the normal non-nucleated erythrocytes only

a small number of white blood cells, most of which were mature, did not show any variation with oxygen tension.

7. Respiration of non-nucleated red blood cells at lowered oxygen tension. (Normal human erythrocytes and erythrocytes of rabbits poisoned with phenylhydrazin)

The results of the experiment with blood containing only a small proportion of white blood cells as compared to a great number of non-nucleated red blood cells (compare C. 6, blood I), implies that non-nucleated human blood cells are independent of oxygen tension. This was confirmed in numerous other experiments. It must, however, be remembered that non-nucleated erythrocytes are very mature cells and, since they have lost their nuclei, in a state of degeneration. This is apparent in their metabolism, in that they show an extremely small rate of respiration (e.g., only 1/200 of the respiration of nucleated human red blood cells; Kempner, '36), and like many injured animal cells both in vivo and in vitro, a relatively high rate of glycolysis in air.

But it would be erroneous to assume that the small rate of respiration as such is the cause of the insensitivity of erythrocytes to variations of oxygen tension. Non-nucleated erythrocytes of rabbits poisoned with phenylhydrazin show a rate of respiration 100 times as high as that of normal human erythrocytes. However, the respiration of these cells suspended in Ringer-bicarbonate-glucose, diluted to three times the original, was found to be the same at an oxygen tension of 6 vol. per cent and in air (Leiner, '35). In order to confirm this for lower oxygen tensions, rabbits were injected over a period of 30 days with 5 to 10 mg. phenylhydrazin daily. The blood was taken by heart puncture in heparin and immediately saturated in the thermostat with a gas mixture of 5 vol. % CO₂/in air. Although all unphysiological conditions, such as centrifuging and diluting with Ringer solution were avoided, there was no difference in the rate of respiration, even at an oxygen tension of 3.8 vol. per cent, compared with an oxygen tension of 19 vol. per cent. These findings show

that the respiration of non-nucleated blood cells is insensitive to variations of oxygen tension irrespective of the magnitude of their absolute rate of respiration.

8. The effect of lowered oxygen tension on the respiration of bacteria

In experiments with bacteria, maintenance of the most favorable environmental conditions causes a difficulty. It is obviously impossible to obtain constant metabolism figures with a growing culture. But, on the other hand, bacteria taken out of their normal nutrient media, washed and suspended in salt solutions without a sufficient supply of oxidizable substances, and kept at low temperatures, are reduced to a state of half-death, like ground liver cells or tissue hash suspended in distilled water. Their respiration is a 'residual respiration,' quantitatively and qualitatively different from the true respiration of cells with intact structure. Regardless of the fact that they may start growing again when replaced in the proper medium, these starved and damaged cells are unsuitable for studying phenomena so sensitive as the effect of changes in oxygen tension on respiration.

To avoid these difficulties as far as possible, bacteria were suspended in salt solutions, to which enough of a nutrient substrate was added to maintain the metabolism at a fairly high rate, but not enough to allow growth. Only very young cultures were used.

In a typical experiment with *Escherichia coli*, broth cultures grown for 2 hours at 38°C. were centrifuged and suspended in a mixture of 4 cc. beef infusion broth + 10 cc. 0.5% glucose-m/15 Soerensen phosphate, pH = 7.3. One cubic centimeter suspension, containing 1.4 mg. bacteria, was pipetted into two conical manometer vessels with 0.2 cc. 10% NaOH in the side bulb to absorb the carbon dioxide produced in respiration or in fermentative splitting processes. In the insert well 10 mg. of palladium were placed to absorb any hydrogen which might be formed under conditions of low oxygen tension (Kempner, '33). The vessels were saturated

as usual and oxygen consumption was measured in three 30-minute periods in air and at 3.5 vol. % O_2 /in N_2 . The shaking speed was 165 oscillations per minute; further increase did not alter the results.

Figure 2 shows the effect of lowered oxygen tension on the respiration of *Escherichia coli* at a temperature of $37.8^\circ C$. The points representing the amounts of oxygen consumed in 90 minutes lie on straight lines; they indicate that the bacteria did not grow during the experiment, even at optimal oxygen tension. At 3.5 vol. per cent oxygen compared with 20 vol.

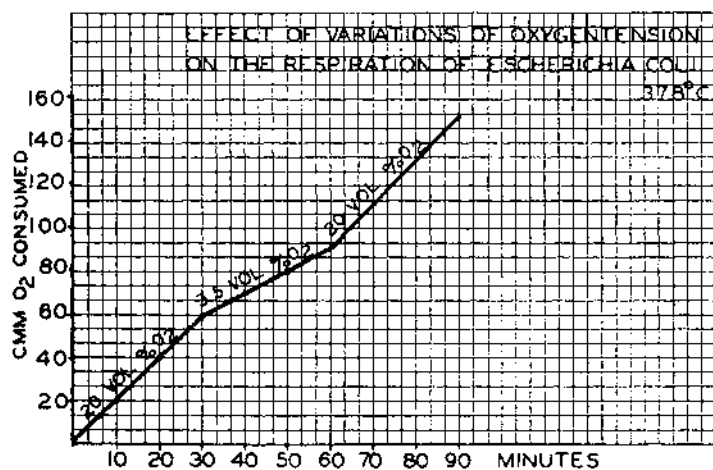


Figure 2

per cent oxygen respiration is inhibited by 50%. The results were the same whether bicarbonate- CO_2 containing solutions or phosphate solutions were used. Unlike erythroblasts (compare C. 6) *Escherichia coli* shows marked variations of respiration with oxygen tension in both suspension media, provided one works with young cells.

9. *Effect of oxygen tension on bacterial respiration catalyzed by iron-free and iron-containing ferment*

In the discussion of previous experiments with pneumococci (Schlayer, '36), it was suggested that the apparently

OXYGEN TENSION AND CELLULAR METABOLISM

357

exceptional sensitivity of their respiration to oxygen tension might be due to the fact that the respiration of the pneumococcus is catalyzed by the iron-free yellow ferment, viz., is not inhibited by carbon monoxide or cyanide. That this is not the explanation, is shown by the effect of oxygen tension on the respiration of nucleated red blood cells inhibited by cyanide, though not by carbon monoxide, and of leukemic blood cells inhibited by HCN as well as by CO.

TABLE 8

Effect of lowered oxygen tension and of carbon monoxide on the respiration of Staphylococcus aureus. One cubic centimeter containing 0.9 mg. bacteria in each vessel (37.8°C.)

| TIME IN MINUTES | VESSEL I | VESSEL II |
|-----------------|----------------------------|--|
| | Air | Air |
| 10 | -13 | -13.5 |
| 10 | -13 | -14 |
| | Air | 3.4% O ₂ /N ₂ |
| 10 | -14 | - 7.5 |
| 10 | -15 | - 8 |
| | 10% O ₂ /90% CO | 10% O ₂ /90% N ₂ |
| 10 | - 7 | -15 |
| 10 | - 6.5 | -15.5 |
| | Air | Air |
| 10 | -16.5 | -17.5 |
| 10 | -16 | -17.5 |

Table 8 shows the effect of oxygen tension on the respiration of bacteria very sensitive to HCN and CO.

Cultures of *Staphylococcus aureus* grown on agar for 14 hours were suspended in phosphate solution containing beef infusion broth, pH = 7.4, and examined in the manner just described. The figures given are 10-minute readings, in two manometer vessels, showing the differences in gas pressures in millimeters Brodie. The intervals for changing the saturation were of 8 minutes. At 3.4 vol. % O₂/in N₂ the respiration is inhibited by 50%, compared with the respiration in air. At 10 vol. % O₂/in CO the respiration of the same bacterial culture is also inhibited by 50% as compared with the respiration at 10 vol. % O₂/in N₂. The respiration of *Staphylo-*

coccus aureus, which is very sensitive to CO, is inhibited by lowered oxygen tension, by the same order of magnitude as is that of the pneumococcus. This means that the rate of bacterial respiration varies with oxygen tension, no matter whether it is catalyzed by the iron-free yellow ferment or the iron-containing phaeohaemin.

10. *The influence of temperature on the variation of bacterial respiration with oxygen tension*

The effect of oxygen tension on bacterial respiration shows very marked dependence on temperature.

A broth culture of *Escherichia coli* 2 hours old was centrifuged and suspended in a mixture of phosphate and beef infusion broth (10:4). The dry weight of bacteria in 1 cc. was 1.8 mg. The determinations were made with the same bacteria suspension in the same manometer vessels, successively at intervals of 3 to 1 hours at 6.5°C., 15.5°C., 22.8°C. and 37.8°C.

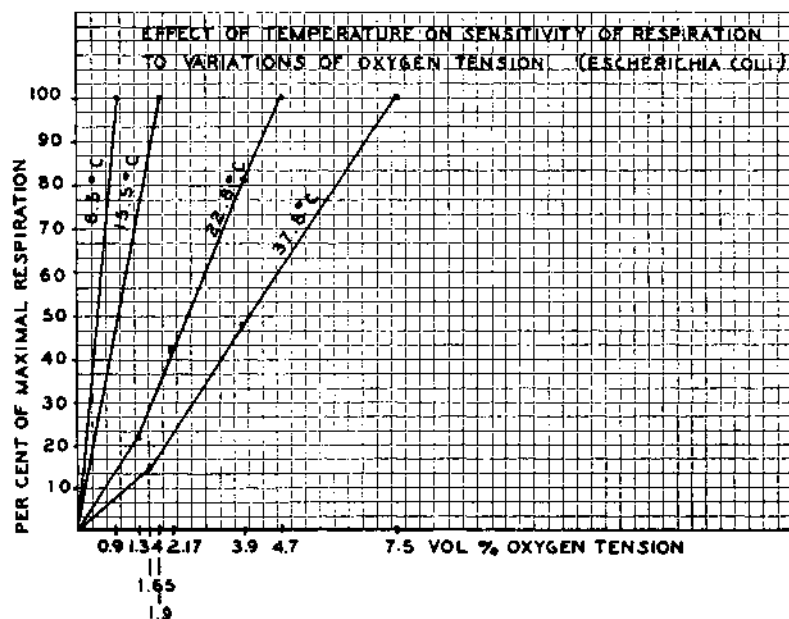


Figure 3

Figure 3 shows the results of the experiment. (The points representing the rate of respiration at various oxygen tensions were connected by straight lines without any preconceived idea about the shape of the curves.) As is seen, with lower temperatures the curves become steeper. At 6.5°C. respiration is still the same as in air at an oxygen tension of 0.9%, whereas at 37.8°C. it is inhibited by 50% at an oxygen tension four times higher. At temperatures between 4°C. and 0°C. one must use extremely low oxygen tensions to find any inhibition of respiration at all, even if one works with very young bacterial cultures in a physiological environment. This explains how it has been possible to overlook altogether the phenomenon of the sensitivity of bacterial respiration to variations of oxygen tension. In the experiments with *Micrococcus candicans* mentioned above (Warburg and Kubowitz, '31), even though oxygen tensions down to 10^{-5} atmospheres were used, the rate of respiration remained unchanged because the experiments were carried out at 1°C. At 38°C. *Micrococcus candicans* at an oxygen tension 2000 times as high (2 vol. per cent) shows an inhibition of respiration of 60%.

11. *The effect of lowered oxygen tension upon bacterial growth*

In bacteria requiring respiration as their main energy supplying reaction, lowered oxygen tensions, which inhibit respiration, also inhibit growth.

A culture of *Staphylococcus aureus* grown on agar for 17 hours was suspended in Ringer-m/100 glucose-m/30 phosphate, pH=7.4. The dry weight of bacteria was 0.3 mg. in 1 cc. suspension at the beginning of the experiment. One cubic centimeter of the suspension was pipetted into the main space of two manometer vessels containing 0.2 cc. 10% NaOH in the insert well and 0.2 cc. beef infusion broth in the side bulb. Vessel I was saturated with air and vessel II with a gas mixture of 3.8 vol. % O_2 in N_2 . The two vessels were shaken in the thermostat at 36°C. at a shaking speed of 170 oscillations per minute. Readings were made every 5 minutes. During an observation period of 20 minutes the rate of

respiration remained constant in both vessels, no growth taking place. The inhibition of respiration in vessel II was 33%. After 20 minutes the broth was tipped in from the side bulb into the main space.

Figure 4 gives the results of the experiment. The points in the curves indicate the amount of oxygen consumed in periods of 10 minutes. The growth is shown by the increase in the

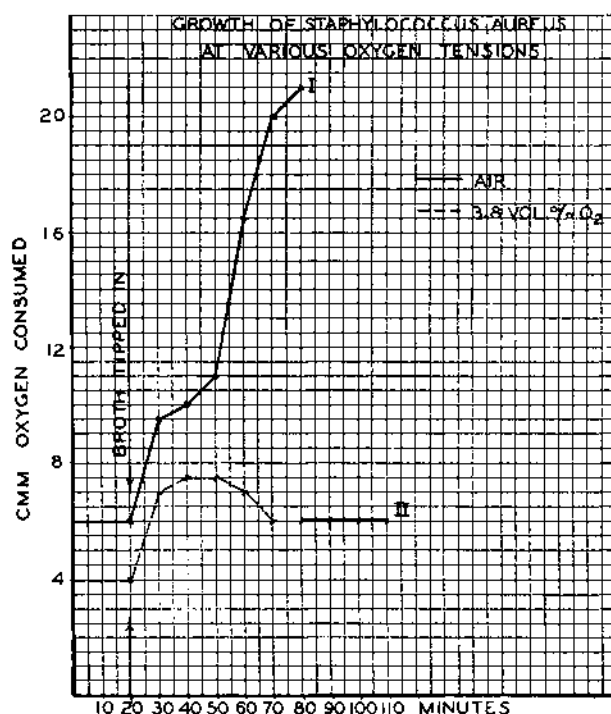


Figure 4

rate of respiration. While in the bacterial culture saturated with air growth starts immediately and increases rapidly after adding the broth, the culture kept under an oxygen tension of 3.8 vol. per cent shows only a small and temporary increase in respiration.

After a period of 50 minutes the mixture of 3.8 vol. % O₂/in N₂ in vessel II was replaced by air. The values obtained

OXYGEN TENSION AND CELLULAR METABOLISM

361

after saturation with air, as shown in the curve, indicate that the low oxygen tension did not only inhibit respiration but also prevented growth.

SUMMARY

The respiration of isolated cells, when undamaged and examined in their physiological environment, decreases with lowered oxygen tension. This variation of respiration with oxygen tension is found in cells sensitive and insensitive to carbon monoxide and cyanide: lymphatic and myeloid leukocytes, erythroblasts of a patient with erythroblastic anemia, erythroblasts of fowls and cold-blooded animals, *Micrococcus candidans*, *Staphylococcus aureus*, pneumococcus, *Escherichia coli*, *Pseudomonas pyocyanea*, *Monilia albicans*. The respiration of non-nucleated blood cells and old bacterial cultures does not vary with oxygen tension.

At lowered oxygen tension there is also a decrease of the respiratory quotient. In goose erythroblasts at 3.8 vol. per cent oxygen the respiration was inhibited by 65% as compared with air; the respiratory quotient was 0.03.

The decrease of respiration at lowered oxygen tension does not cause an increase of lactic acid formation. Despite 65% inhibition of respiration at 3.8 vol. per cent oxygen, the rate of lactic acid formation remained as low as in air. The Pasteur reaction, the disappearing of lactic acid formation in the presence of oxygen, is not dependent on the rate of respiration, but directly on oxygen tension.

The effect of oxygen tension on respiration is sensitive to changes in pH, carbon dioxide concentration, salt content and temperature.

The growth of aerobic bacteria is inhibited by lowered oxygen tension.

LITERATURE CITED

- AMBERSON, W. R. 1928 The influence of oxygen tension upon the respiration of unicellular organisms. *Biol. Bull.*, vol. 55, p. 79.
- BUMM, E., H. APPEL AND K. FEHRENBACH 1934 Über die Beziehungen zwischen Glykolyse und Atmung im tierischen Gewebe. *Ztschr. f. physiol. Chem.*, Bd. 223, S. 207.
- BURK, D. 1930 The influence of nitrogen gas upon the organic catalysis of nitrogen fixation by *Azotobacter*. *J. Phys. Chem.*, vol. 34, pp. 1174 and 1195.
- DIXON, H., AND K. A. C. ELLIOT 1929 Effect of cyanide on respiration of animal tissues. *Biochem. J.*, vol. 23, p. 812.
- FRIEDEMANN, T. E., M. COTONIO AND P. A. SCHAEFFER 1927 Determination of lactic acid. *J. Biol. Chem.*, vol. 73, p. 335.
- FRIEDEMANN, T. E., AND Y. B. GRAESER 1933 The determination of lactic acid. *J. Biol. Chem.*, vol. 100, p. 291.
- FRIEDEMANN, T. E., AND A. T. KENDALL 1929 The determination of lactic acid. *J. Biol. Chem.*, vol. 82, p. 23.
- GERARD, R. W. 1931 Oxygen diffusion into cells. *Biol. Bull.*, vol. 60, p. 245.
- GERARD, R. W., AND T. S. FALK 1931 Observations on the metabolism of *Sarcina lutea*. *Biol. Bull.*, vol. 60, p. 213.
- IWASAKI, K. 1930 Weitere Untersuchungen zur Fixation des Luftstickstoffs durch *Azotobakter*. *Biochem. Ztschr.*, Bd. 226, S. 32.
- KEMPNER, W. 1933 Wirkung der Blausäure und des Kohlenoxyds auf die Buttersäuregärung. *Biochem. Ztschr.*, Bd. 257, S. 41.
- 1936 a Effect of low oxygen tension on respiration and fermentation of isolated cells. *Proc. Soc. Exp. Biol. and Med.*, vol. 35, p. 148.
- 1936 b Metabolism of human erythroblasts. *J. Clin. Inv.*, vol. 15, p. 679.
- KEMPNER, W., AND E. PESCHEL 1930 Stoffwechsel der Entzündung. *Ztschr. f. klin. Med.*, Bd. 114, S. 439.
- LEINER, G. 1935 Sauerstoffdruck und Gärung. *Biochem. Ztschr.*, Bd. 276, S. 186.
- LOHMANN, R. 1931 Krebsstoffwechsel und Entzündung. *Klin. Wochenschr.*, Bd. 39, S. 1799.
- LUND, E. J. 1918 Quantitative studies on intracellular respiration. *Am. J. Physiol.*, vol. 45, p. 451.
- MEYERHOF, O. 1930 Chemische Vorgänge im Muskel. Springer, Berlin.
- MEYERHOF, O., AND D. BURK 1928 A Über die Fixation des Luftstickstoffs durch *Azotobakter*. *Ztschr. f. physiol. Chem. (Haberfestschrift)*, Bd. 139, S. 117.
- MEYERHOF, O., AND W. SCHULZ 1932 Über die Abhängigkeit der Atmung der *Azotobakter* vom Sauerstoffdruck. *Biochem. Ztschr.*, Bd. 250, S. 35.
- OPPENHEIMER, C. 1925 Die Fermente, vol. 2, p. 1402. Thieme, Leipzig.
- SCHLAYER, C. 1936 The influence of oxygen tension on the respiration of pneumococci (type I). *J. Bact.*, vol. 31, p. 181.
- SHOUP, C. S. 1929 The respiration of luminous bacteria and the effect of oxygen tension upon oxygen consumption. *J. Gen. Physiol.*, vol. 13, p. 27.

OXYGEN TENSION AND CELLULAR METABOLISM 363

- TANG, P. S. 1931 The oxygen tension-oxygen consumption curve of unfertilized *Arbacia* eggs. *Biol. Bull.*, vol. 60, p. 242.
- TANG, P. S., AND FRENCH 1933 The rate of oxygen consumption by *Chlorella pyrenoidosa* as a function of temperature and of oxygen tension. *Chin. J. Phys.*, vol. 7, p. 353.
- TANG, P. S., AND R. W. GERARD 1932 The oxygen tension oxygen consumption curve of fertilized *Arbacia* eggs. *J. Cell. and Comp. Physiol.*, vol. 1, p. 503.
- WARBURG, O. 1908 Beobachtungen über die Oxydationsprozesse im Seeigeelei. *Ztschr. f. physiol. Chem.*, Bd. 57, S. 1.
- 1914 Beiträge zur Physiologie der Zelle insbesondere über die Oxydationsgeschwindigkeit in Zellen. *Erg. d. Phys.*, Bd. 14, S. 264.
- 1926 a Stoffwechsel der Tumoren. Springer, Berlin.
- 1926 b Über die Wirkung des Kohlenoxyds auf den Stoffwechsel der Hefe. *Biochem. Ztschr.*, Bd. 177, S. 471.
- 1927 Über die Wirkung von Kohlenoxyd und Stickoxyd auf Atmung und Gärung. *Biochem. Ztschr.*, Bd. 189, S. 354.
- 1929 Atmungsferment und Sauerstoffspeicher. *Biochem. Ztschr.*, Bd. 214, S. 4.
- WARBURG, O., AND F. KUBOWITZ 1931 Atmung bei sehr kleinen Sauerstoffdrucken. *Biochem. Ztschr.*, Bd. 214, S. 5.
- WARBURG, O., F. KUBOWITZ AND W. CHRISTIAN 1931 Über die Wirkung von Phenylhydrazin und Phenylhydroxylamin auf den Stoffwechsel von roten Blutzellen. *Biochem. Ztschr.*, Bd. 242, S. 170.

Gasstoffwechsel und Glykogenzerfall
[Metabolism of Gases and Pathologic Glycogen Breakdown]

Metabolism of Gases and Pathologic Glycogen Breakdown

by Ruth Lohmann

It was found recently that during pathologic breakdown of glycogen the assimilation of glucose into glycogen is significantly disturbed. The question is, what happens to glucose that has not been assimilated into glycogen? One supposition was that the sugar was burned; if this had been so, oxygen would have been used and carbonic acid released. In experiments on a series of 18 animals, these changes were not found.

SONDERDRUCK AUS
**KLINISCHE
 WOCHENSCHRIFT**

ORGAN DER GESELLSCHAFT DEUTSCHER NATURFORSCHER UND ÄRZTE
 VERLAG VON JULIUS SPRINGER, BERLIN, UND J. F. BERGMANN, MÜNCHEN

JAHRG. 16

27. NOVEMBER 1937

Nr. 48, S. 1682/1684

GASSTOFFWECHSEL UND GLYKOGENZERFALL.

Von

RUTH LOHMANN.

Aus der II. Medizinischen Klinik der Charité
 (Direktor: Professor Dr. G. von BERGMANN).

Die bisher bekannten für den Glykogenzerfall charakteristischen Symptome weisen auf eine allgemeine Störung des Stoffwechsels, speziell des Kohlehydratstoffwechsels hin. So hat BRENTANO¹ neuerdings gefunden, daß während des Glykogenzerfalls — der immer mit einer Kreatinurie verbunden ist und mit dem Nachweis von Kreatin im Harn leicht festgestellt wird — eine erhebliche Störung der Assimilation von Traubenzucker zu Glykogen besteht. Während bei normalen, nichtkreatinurischen Tieren nach Zuckerfütterung (10 g/kg Traubenzucker per os) das Muskelglykogen um den 2 $\frac{1}{2}$ -fachen, das Leberglykogen um den 18fachen Betrag zunimmt, ist diese Glykogenzunahme während der Kreatinurie beträchtlich herabgesetzt, um die Hälfte im Muskel und um $\frac{1}{3}$ in der Leber.

Was geschieht nun mit dem nicht zu Glykogen gewordenen Zucker? Er häuft sich weder im Blut an noch wird er im Urin ausgeschieden. BRENTANO¹ äußert die Vermutung, daß der nicht zu Glykogen assimilierte Zucker vielleicht verbrannt wird. In diesem Sinne sprachen Versuche von SUGIMOTO², BAUR² und ABELIN².

Eine Mehrverbrennung von Zucker muß sich in einer Steigerung des Sauerstoffverbrauchs äußern. Der Gasstoffwechselversuch ist daher geeignet, Antwort zu geben auf die Frage, ob der nicht assimilierte Zucker verbrannt wird.

Unsere Versuche wurden aus methodischen Gründen an Tieren (Kaninchen) durchgeführt.

Zur Messung des Gasstoffwechsels diente die von JUNKMANN³ angegebene „Gasstoffwechselapparat für Kleintiere“, die für Kaninchen entsprechend modifiziert wurde. (Die Apparat wurde uns liebenswürdigerweise von der Firma Schering-Kahlbaum und Herrn Dr. JUNKMANN hergestellt und überlassen, wofür wir auch an dieser Stelle herzlich danken.) Das Prinzip des Apparates ist kurz folgendes: In einem abgeschlossenen Luftraum wird mit Hilfe einer durch tropfende Kalilauge betriebenen Saugdruckpumpe erstens erreicht, daß die Luft zirkuliert, zweitens, daß die ausgeatmete

Kohlensäure des Tieres durch die Kalilauge absorbiert wird. Der Sauerstoff wird aus einem Sauerstoffbehälter regelmäßig nachgeliefert, wenn ein bestimmtes Defizit (10% des Sauerstoffgehaltes) erreicht ist. Die Nachlieferung erfolgt mittels eines Ventils, das durch elektrischen Kontaktschluß gesteuert wird. Aus der Anzahl der Kontaktschlüsse ergibt sich die Menge des nachgelieferten (d. h. also auch verbrauchten) Sauerstoffes. [Genauere Angaben über die Apparatur s. Z. exper. Med. 97, 155 (1935).]

Die Tiere, durchschnittlich 2–2,5 kg schwer, befinden sich während des Versuchs im Tierbehälter des Apparates, dessen Ausmaße ein ruhiges Sitzen gewährleisten, ohne wesentliche Bewegungen zu gestatten. Der Versuch verläuft so, daß nach einer Vorperiode von jeweils 20–25 Minuten, in der einmal geeicht, d. h. die während eines Kontaktschlusses verbrauchte Sauerstoffmenge festgestellt wird, laufend über 2–3 Stunden der Sauerstoffverbrauch gemessen wird. Nach Beendigung des Versuchs wird noch einmal geeicht. Zur Berechnung des Sauerstoffverbrauchs ist die Anzahl der Kontaktschlüsse mit dem Mittel der Eichwerte zu multiplizieren und nach den von JUNKMANN angegebenen Formeln auf eine Stunde unter Berücksichtigung von Gewicht des Tieres, Barometerstand und Temperatur umzurechnen.

Das Versuchstier wurde 24 Stunden vor Beginn des Versuches nüchtern gehalten und der Nüchtern-Grundumsatz mehrfach, nach dazwischengeschalteten Tagen mit normaler Fütterung, bestimmt. Für die Gasstoffwechseluntersuchungen nach Zuckerbelastung wurde dem wiederum 24 Stunden nüchtern gehaltenen Tiere 5 g Traubenzucker pro Kilogramm Körpergewicht (in Form von 50proz. Zuckerlösung) durch die Sonde gegeben. Der Urin des Tieres wurde am Versuchstag auf Freisein von Kreatin kontrolliert. Zunächst wurden die Tiere in nichtkreatinurischem Zustand untersucht, jeweils 2–3 mal nüchtern und 2–3 mal nach Zuckerbelastung. Dann wurde bei denselben Tieren künstlich eine Kreatinurie hervorgerufen — als Mittel zur Erzeugung der Kreatinurie dienten Hunger, Urethan, Chinin, Glykokoll, Thyroxin, in der früher genau beschriebenen Weise⁴ — und nunmehr während der Kreatinurie wieder nüchtern und nach Zuckerbelastung der Gasstoffwechsel gemessen.

Tabelle 1 zeigt die Versuchsergebnisse: *Eine Oxydationssteigerung nach Zucker während der Kreatinurie (d. h. während des Glykogenzerfalls) findet nicht statt.* Der Sauerstoffverbrauch ist im Rahmen der physiologischen Schwankungen stets der gleiche, ob eine Kreatinurie bzw. ein Glykogenzerfall vorliegt oder nicht.

Die Apparatur ist so eingerichtet, daß nicht nur der Sauerstoffverbrauch, sondern auch die Kohlensäureabgabe gemessen werden kann. Dadurch ist es möglich, auch das *Verhalten des Respiratorischen Quotienten* (R. Q.) zu beobachten. Die Bestimmung der abgegebenen Kohlensäure erfolgt durch Titrieren der Kalilauge, die während des Versuches durch die Fallrohre der Saugdruckpumpe gegangen ist.

Es zeigte sich ein unterschiedliches Verhalten des R. Q. nach Zuckerbelastung bei kreatinfreien und kreatinurischen Tieren. Während normalerweise, wie bekannt, der R. Q. nach Zuckerbelastung auf etwa 1,0 steigt, also eine beträchtliche

— 3 —

Zunahme gegenüber dem Nüchtern-R. Q. erfolgt, ist dieser Anstieg des R. Q. bei kreatinurischen Tieren erheblich geringer und bleibt zuweilen ganz aus. So steigt z. B. der R. Q. ohne Kreatinurie von 0,75 nüchtern auf 0,98 nach Zuckerbelastung, d. h. also um 30,7 %; im kreatinurischen Zustand steigt er beim selben Tier von 0,76 nüchtern auf 0,82 nach Zuckerbelastung, d. h. also nur um 7,9 %. In einem anderen Fall ist im nicht-kreatinurischen Zustand der R. Q. nüchtern 0,80, nach Zuckerbelastung 1,13, und während der Kreatinurie 0,74 sowohl nüchtern als nach Zuckerbelastung; hier bleibt ein An-
Tabelle 1. Der Sauerstoffverbrauch nach Zuckerfütterung vor und während einer Kreatinurie.

| Tier Nr. | Versuch Nr. | Kreatinurie | Kreatinurie hervorgerufen durch | Nüchtern (N) oder nach Zuckerbelastung (Z) | O ₂ -Verbrauch pro 100 g und Stunde (in cem) | Steigerung des O ₂ -Verbrauchs nach Zucker % |
|----------|-------------|-------------|---------------------------------|--|---|---|
| 73 | 7 | ø | | N | 45,5 | |
| | 14 | ø | | Z | 51,9 | 14,1 |
| | 16 | + | Hunger | N | 46,2 | |
| | 20 | + | | Z | 50,2 | 8,7 |
| 75 | 38 | ø | | N | 38,8 | |
| | 50 | ø | | Z | 47,0 | 21,1 |
| | 53 | + | Urethan | N | 40,2 | |
| | 54 | + | | Z | 45,0 | 11,9 |
| 77 | 41 | ø | | N | 63,1 | |
| | 52 | ø | | Z | 74,0 | 17,3 |
| | 55 | + | Hunger | N | 56,0 | |
| | 57 | + | | Z | 65,7 | 17,3 |
| 80 | 66 | ø | | N | 49,1 | |
| | 70 | ø | | Z | 56,7 | 15,5 |
| | 71 | + | Spontan | N | 56,4 | |
| | 72 | + | | Z | 61,0 | 8,2 |
| 85 | 90 | ø | | N | 59,0 | |
| | 91 | ø | | Z | 63,0 | 6,8 |
| | 93 | + | Glucocoll | N | 59,5 | |
| | 95 | + | | Z | 64,3 | 8,1 |
| 81 | 73 | ø | | N | 51,0 | |
| | 76 | ø | | Z | 68,5 | 34,3 |
| | 78 | + | Hunger | N | 54,4 | |
| | 79a | + | | Z | 65,0 | 19,5 |
| 89 | 97 | ø | | N | 56,4 | |
| | 99 | ø | | Z | 57,5 | 0 |
| | 100 | + | Glykokoll | N | 58,3 | |
| | 101 | + | | Z | 54,2 | 0 |
| 97 | 129 | ø | | N | 43,5 | |
| | 136 | ø | | Z | 55,5 | 27,6 |
| | 139 | + | Chinin | N | 42,9 | |
| | 141 | + | | Z | 49,7 | 15,8 |

— 4 —

Tabelle 2. Der Respiratorische Quotient nach Zuckernahrung vor und während einer Kreatinurie.

| Tier Nr. | Versuch Nr. | Kreatinurie | Kreatinurie hervorgerufen durch | Nüchtern (N) oder nach Zuckerbelastung (Z) | Respiratorischer Quotient (R. Q.) | Steigerung des R. Q. nach Zucker % | Einfluß der Kreatinurie auf die Steigerung des R. Q. % |
|----------|-------------|-------------|---------------------------------|--|-----------------------------------|------------------------------------|--|
| 77 | 41 | 0 | | N | 0,76 | | |
| | 52 | 0 | | Z | 0,95 | 25,0 | |
| | 55 | + | Hunger | N | 0,71 | | |
| | 57 | + | | Z | 0,77 | 8,4 | — 66,4 |
| 76 | 35 | 0 | | N | 0,87 | | |
| | 40 | 0 | | Z | 1,09 | 25,3 | |
| | 47 | + | Glycocoll | N | 0,71 | | |
| | 48 | + | | Z | 0,79 | 11,3 | — 55,3 |
| 75 | 38 | 0 | | N | 0,77 | | |
| | 50 | 0 | | Z | 0,87 | 13,0 | |
| | 53 | — | Urethan | N | 0,70 | | |
| | 54 | + | | Z | 0,71 | 1,4 | — 89,2 |
| 79 | 62 | 0 | | N | 0,80 | | |
| | 64 | 0 | | Z | 0,97 | 21,2 | |
| | 67 | + | Hunger | N | 0,80 | | |
| | 65 | + | | Z | 0,93 | 16,2 | — 23,6 |
| 72 | 58 | 0 | | N | 0,78 | | |
| | 59 | 0 | | Z | 0,90 | 15,4 | |
| | 60 | + | Spontan | N | 0,75 | | |
| | 61 | + | | Z | 0,69 | 0 | — 100 |
| 74 | 17 | 0 | | N | 0,80 | | |
| | 23 | 0 | | Z | 1,13 | 41,2 | |
| | 27 | + | Thyroxin | N | 0,74 | | |
| | 32 | — | | Z | 0,74 | 0 | — 100 |
| 73 | 7 | 0 | | N | 0,75 | | |
| | 14 | 0 | | Z | 0,98 | 30,7 | |
| | 16 | + | Hunger | N | 0,76 | | |
| | 20 | + | | Z | 0,82 | 7,9 | — 74,3 |
| 80 | 66 | 0 | | N | 0,77 | | |
| | 70 | 0 | | Z | 1,12 | 45,5 | |
| | 71 | + | Spontan | N | 0,70 | | |
| | 72 | + | | Z | 0,86 | 22,8 | — 49,9 |

stieg des R. Q. überhaupt aus. Im ganzen wurde an 18 Tieren diese Serie von Gasstoffwechseluntersuchungen durchgeführt; es ergaben sich also 18 Versuchsgruppen. Sie sind in ihren Resultaten völlig gleichsinnig, so daß es sich erübrigte, sie sämtlich einzeln aufzuführen. 8 Versuchsgruppen wurden in Tabelle 2 zusammengestellt. Aus der letzten Spalte der Tabelle ergibt sich eine durchschnittliche Verringerung des R. Q.-Anstiegs um 69,8 % während der Kreatinurie, der R. Q. steigt also nicht ganz um $\frac{1}{3}$, verglichen mit dem Anstieg im kreatin-

— 5 —

freien Zustand. Diese Verringerung von 69,8 % stimmt mit dem Durchschnitt bei den gesamten Versuchsgruppen überein.

Aus diesem Verhalten des R. Q. muß geschlossen werden, daß im Zustand des Glykogenzerfalls der Zucker nicht nur nicht vermehrt verbrannt wird, sondern im Gegenteil, daß er vermindert verbrannt wird. Denn der R. Q. von etwa 0,8 zeigt an, daß die Kohlehydratverbrennung gegenüber der Fettverbrennung zurückgetreten ist, obgleich eine erhebliche Kohlehydratbelastung stattgefunden hatte. Dieser Befund paßt zu den Untersuchungsergebnissen von BRENTANO¹, der nachgewiesen hat, daß während der Kreatinurie ein gesteigerter Fettumsatz stattfindet. Ein derartiges Verhalten des R. Q. wurde bisher als spezifisch angesehen für die Stoffwechselstörung des Diabetes mellitus oder allgemeiner für eine Störung des Inselapparates im Pankreas (v. NOORDEN-ISAAC², GELMUYDEN³, BORNSTEIN-GRIESBACH-HOLM⁴, HORNE-MANN⁵). Die vorliegenden Versuche zeigen aber, daß die Hemmung des Anstiegs des R. Q. nicht ein einer bestimmten Krankheit spezifisch zugeordnetes Symptom darstellt, sondern daß sie überall da gefunden wird, wo Glykogenzerfall besteht.

Literatur: ¹ BRENTANO, Z. exper. Med. 98, 677 (1936). — ² SUGIMOTO, BAUR, ABELIN, zit. nach BRENTANO, Z. exper. Med. — ³ JUNKMANN, Z. exper. Med. 97, 155 (1935). — ⁴ BRENTANO, Naunyn-Schmiedeberg's Arch. 155, 21 (1930). — ⁵ BRENTANO, Z. klin. Med. 124, 237 (1933) — Dtsch. med. Wschr. 1933, 448. — ⁶ v. NOORDEN-ISAAC, Die Zuckerkrankheit und ihre Behandlung. 1927. — ⁷ GELMUYDEN, Erg. Physiol. 31 (1931). — ⁸ BORNSTEIN-GRIESBACH-HOLM, Z. exper. Med. 43, 397 (1924). — ⁹ HORNE-MANN, Z. exper. Med. 37, 65 (1923).

***Verminderter Sauerstoffdruck in der Niere
als Ursache der "reversiblen" urämischen Acidose
[Anoxemia of the Kidney as a Cause of Reversible Uremic Acidosis]***

VERMINDERTER
SAUERSTOFFDRUCK IN DER NIERE
ALS URSACHE DER „REVERSIBLEN“
URÄMISCHEN ACIDOSE

VON

WALTER KEMPNER
AUS DER MEDIZINISCHEN KLINIK DER DUKE UNIVERSITÄT
DURHAM N.C. USA.
(DIREKTOR: PROF. DR. F. M. HANES)

SONDERDRUCK
AUS KLINISCHE WOCHENSCHRIFT
1938, NR. 28, SEITE 971—973

VERLAGSBUCHHANDLUNG JULIUS SPRINGER IN BERLIN

SONDERDRUCK AUS
**KLINISCHE
 WOCHENSCHRIFT**

ORGAN DER GESELLSCHAFT DEUTSCHER NATURFORSCHER UND ÄRZTE
 VERLAG VON JULIUS SPRINGER, BERLIN, UND J. F. BERGMANN, MÜNCHEN

JAHRG. 17

9. JULI 1938

Nr. 28, S. 971/973

**VERMINDERTER SAUERSTOFFDRUCK IN DER
 NIERE ALS URSACHE DER „REVERSIBLEN“
 URÄMISCHEN ACIDOSE.**

Von

WALTER KEMPNER.

Aus der Medizinischen Klinik der Duke Universität, Durham N.C. USA.
 (Direktor: Prof. Dr. F. M. HANES).

Die urämische Acidose kann bedingt sein lediglich durch eine „Betriebsstörung“¹ der Stoffwechselfunktion der Niere, d. h. durch ein Versagen nicht ihrer *sekretorischen*, sondern ihrer *chemischen* Leistungen. Der Mechanismus ist so: Die Ammoniakausscheidung durch die Niere ist, wie man seit den Arbeiten von WALTER², HALLERVORDEN³, CORANDA⁴, GAETHGENS⁵, STADELMANN⁶, MINKOWSKI⁷, WINTERBERG⁸, HENDERSON und PALMER⁹, MUENZER¹⁰, HASSELBALCH¹¹ weiß, ein wesentlicher Faktor für die Erhaltung des Säure-Basen-Gleichgewichts im Körper. Wie NASH und BENEDICT¹² gefunden haben, wird der im Harn ausgeschiedene Ammoniak nicht vom Blut in die Niere gebracht, sondern in der Niere gebildet. Der Gehalt der Nierenvene an Ammoniak war beträchtlich größer als der der Nierenarterie. Die Substanzen, aus denen die Niere den Ammoniak bildet, sind, wie KREBS¹³ gezeigt hat, Aminosäuren.

Das Bicarbonat, das die im Blut und in den Geweben auftretenden Säuren gebunden hat, wird in der gesunden Niere gegen Ammoniak ausgetauscht und in die Blutbahn zurückgegeben. Die Säuren werden als Ammoniaksalze im Harn ausgeschieden. Der Bicarbonatgehalt des Blutes bleibt konstant. Vermehrter Säuregehalt des Blutes kann durch vermehrte Ammoniakbildung in der Niere kompensiert werden. Beim ketonämischen Diabetes mellitus mit funktionstüchtiger Niere steigt die Ammoniakausscheidung im Harn auf ein Vielfaches des Normalen.

Eine Störung des Säure-Basen-Gleichgewichtes tritt auf, wenn die Ammoniakbildung in der Niere nicht mehr Schritt halten kann mit der Säurebildung im Körper. Dann werden Säuren als Natriumsalze ausgeschieden, das Blut verarmt an Bicarbonat. Bei der diabetischen Acidose entsteht dies Mißverhältnis zwischen den im Körper gebildeten Säuren und dem in der Niere gebildeten Ammoniak durch pathologische

— 2 —

Vermehrung der Säurebildung. Die renale Acidose hingegen wird auftreten, wenn, auch bei gleichbleibender Säurebildung, die Fähigkeit der Niere nachläßt, Aminosäuren zu desaminieren. Bei zahlreichen pathologischen Zuständen der Niere sinkt die Ammoniakausscheidung im Harn auf minimale Werte (HENDERSON und PALMER⁸, VAN SLYKE¹⁴, RABINOVITCH¹⁵, MAGNUS-LEVY¹⁶).

Es ist verständlich, warum bei anatomischer Zerstörung, bei Ersetzung chemisch aktiver Nierenzellen durch Narbengewebe, etwa bei ausgedehnter Nierentuberkulose¹³ oder bei Schrumpfnieren, die Desaminierung der Aminosäuren in der Niere versagt und nur eine ungenügende Ammoniakbildung resultiert. Unerklärt dagegen bleiben die Zustände vorübergehender renaler „Betriebsstörung“ bei spastischen, embolischen oder entzündlichen Prozessen in der Niere, bei dekompensierten Herzkrankheiten, Hypertonus, schweren Anämien, wo eine reversible renale Acidose auftritt, die mit der Besserung des Grundleidens nach kürzerer oder längerer Dauer wieder verschwindet. Die übliche Erklärung für diese reversible Acidose ist, daß der Funktionsausfall der zerstörten Nierenzellen ausgeglichen werde durch eine Mehrarbeit der gesunden Nierenteile, oder man sagt mit chemisch nicht ganz klar definierter Terminologie, die Nierenzellen hätten die Krankheit überstanden und sich erholt.

Zweck dieser Arbeit ist es, gerade für solche *vorübergehenden* urämischen Zustände eine experimentelle Erklärung zu geben und zu zeigen, daß *das Aufhören der Desaminierung der Aminosäuren und folglich der Ammoniakbildung* in der Niere nicht bedingt sein muß durch irreversible Zellzerstörung, sondern, im gleichen Maße und mit den gleichen Folgen für den Gesamtorganismus, *bedingt sein kann durch eine reversible Hemmung der chemischen Funktionen der Nierenzellen auf Grund einer bloßen Änderung im Gasmilieu des betroffenen Gewebes*.

Daß es unter pathologischen Bedingungen zu einer mehr oder minder lange anhaltenden Sauerstoffverarmung des betroffenen Gewebes kommt, ist anzunehmen: Die Sauerstoffversorgung des Gewebes ist abhängig von der Blutversorgung und von der Diffusionsgeschwindigkeit des vom Blut gelieferten Sauerstoffs durch die Gewebsflüssigkeit zur Oberfläche der einzelnen, Stoffwechselarbeit leistenden Zellen. Jede Störung der Blutversorgung, beginnend mit der einfachen Blutstase oder dem Spasmus der kleinen Nierengefäße (VOLHARD¹⁷), mag zu einer reversiblen Anoxie des Zellmilieus führen; ebenso jede Veränderung der Diffusionsgeschwindigkeit, z. B. bei „Nierenschwellung“. Daß unter den Bedingungen der Entzündung, mit der Dauer der Entzündung fortschreitend, der Sauerstoffdruck im entzündeten Gewebe sinkt, wurde in einer früheren Arbeit¹⁸ mit einer manometrischen Methode (Verbrennung kleiner Sauerstoffmengen in Wasserstoffatmosphäre) quantitativ bestimmt. Wir fanden in

— 3 —

sterilen Hautblasen nach 24 Stunden Entzündungsdauer einen durchschnittlichen Sauerstoffdruck von 70 mm Hg, nach 45 Stunden von 40 mm Hg, nach 65 Stunden von 21 mm Hg. Der geringste Sauerstoffdruck in dieser Versuchsreihe war 6 mm Hg. Bereits damals haben wir die Frage diskutiert, wie die oxydativen Gewebsreaktionen durch diese Veränderungen des Sauerstoffdrucks beeinflusst würden und kamen auf Grund der übereinstimmenden Literatur¹⁹ zu dem Ergebnis, daß trotz der von uns gefundenen starken Verminderung des Sauerstoffdrucks im entzündeten Gewebe von einer Anaerobiose im strengen Sinn nicht gesprochen werden könnte und deshalb die Größe der Zellatmung unverändert bleiben müßte, gemäß dem Warburgschen „Alles-oder-Nichts-Gesetz der Zellatmung“^{20, 21, 22, 23} und der „allgemeinen Erfahrung mit der Atmung tierischer Organe“ (MEYERHOF²⁴). Denn WARBURG²¹ hatte bei Kulturen von *Micrococcus candidans*, die er bei Temperaturen von 1–10° in Kochsalz-Phosphat-Lösungen untersuchte, gefunden, daß man zu minimalen Sauerstoffdrücken (0,008 mm Hg) heruntergehen könne und daß trotzdem die Größe der Atmung dieselbe bleibe wie in Luft, vorausgesetzt, daß eine genügende Sauerstoffmenge vorhanden wäre. Die Atmung sei unabhängig von der Sauerstoffkonzentration, die Zelle setze ihre maximale Atmung so lange fort, bis aller vorhandene Sauerstoff verbraucht sei.

Unsere Versuche der letzten Jahre über die Wirkung des Sauerstoffdrucks auf die Atmung zahlreicher isolierter Körperzellen und Bakterien (einschl. *Micrococcus candidans*)^{25, 26, 27, 28} haben jedoch gezeigt, daß ein solches „Alles-oder-Nichts-Gesetz der Zellatmung“ keineswegs besteht, sondern im Gegenteil, die Zellatmung sehr beträchtlich mit Änderungen des Sauerstoffdrucks variiert. Die Dissoziation der Atmungsferment-Sauerstoff-Verbindung ist allerdings (ähnlich der Dissoziation der Hämoglobin-Sauerstoff-Verbindung) eine sehr temperaturempfindliche Reaktion und abhängig von der chemischen Zusammensetzung des Suspensionsmediums, so daß es erklärlich ist, warum das ganze Phänomen der Abhängigkeit der Atmung vom Sauerstoffdruck übersehen werden mußte, wenn die Versuche weder in einem physiologischen Milieu noch bei Körpertemperatur ausgeführt wurden. Wir fanden die Atmung menschlicher weißer Blutzellen, z. B. bei einer Temperatur von 15°, in einer Sauerstoffatmosphäre von 7,6 mm Hg (1 Vol.-%) noch maximal, bei 37° hingegen bereits in einer Sauerstoffatmosphäre von 41 mm Hg (5,4 Vol.-%) um 60% gehemmt²⁷.

Nachdem die hemmende Wirkung verminderten Sauerstoffdrucks auf die Zellatmung isolierter Körperzellen und Bakterien festgestellt war, lag es nahe, die Wirkung des verminderten Sauerstoffdrucks auf die Geschwindigkeit der Desaminierung der Aminosäuren in der Niere zu untersuchen.

— 4 —

Als Versuchsmaterial dienten Schnitte überlebenden Nierengewebes von Ratten und Kaninchen. Um die Fehlerquelle ungenügender Diffusion auszuschalten, wurden nur Schnitte von ungefähr 0,05 mm Dicke verwendet (Trockengewicht 2–3 mg). Die Schnitte wurden in Serum oder physiologischen Ringerbicarbonat- oder Kochsalzphosphatlösungen in Gegenwart und Abwesenheit von Aminosäuren (d,l-Alanin, d,l-Valin, d,l-Leucin) bei 37,5° untersucht. Die Konzentration der Aminosäuren in der Suspensionsflüssigkeit war m/20 bis m/100. Bei einer Reihe von Versuchen wurden die Schnitte während einer 1stündigen Vorperiode anaerob gehalten, wodurch Atmung und Oxydation von Ketosäuren irreversibel gehemmt werden, während die Fähigkeit zur Desaminierung der Aminosäuren noch 2–3 Stunden lang erhalten bleibt. Der Sauerstoffverbrauch bei der Desaminierung (wie NEUBAUER²⁹ und KNOOP³⁰ gezeigt haben, ist die *oxydative* Desaminierung der Aminosäuren praktisch der einzige Weg der Desaminierung im Körper) wurde manometrisch nach der Warburgschen Methode³¹ gemessen. Der Aminosäurenverbrauch wurde nach der van Slykeschen manometrischen Ninhydrinmethode³² in der Modifikation von SCHLAYER³³ bestimmt. Stickstoff-Sauerstoffgemische verschiedenen Sauerstoffpartialdrucks wurden im Quecksilbergasometer (2 l) hergestellt. Die Schüttelgeschwindigkeit der Manometergefäße wurde so gewählt, daß der Sauerstoffverbrauch des Nierengewebes bei Erhöhung der Schwingungszahl unverändert blieb (165 Schwingungen pro Minute).

Wie Tabelle 1 zeigt, ist bei der Desaminierung von $m/24$ -d,l-Valin der Sauerstoffverbrauch von überlebenden Nierenschnitten der Ratte bei einem Sauerstoffdruck von 42,5 mm Hg (5,6 Vol.-%) gegenüber dem Sauerstoffverbrauch in Luft um 53 % gehemmt.

Tabelle 1. Wirkung des Sauerstoffdrucks auf den Sauerstoffverbrauch von Schnitten überlebenden Rattennierengewebes bei der Desaminierung von d,l-Valin ($m/24$). 37,5°. Q_{O_2} = cmm Sauerstoff, verbraucht von 1 mg Nierengewebe (Trockengewicht) in 1 Stunde.

| Vol. % O_2 | Q_{O_2} Gesamtsauerstoffverbrauch | | Q_{O_2} Sauerstoffverbrauch bei der Oxydation von d,l-Valin II—I |
|-----------------|--|------------------------------|--|
| | I | II | |
| | 0,9% NaCl/ $m/24$ | Phosphat $m/24$ d,l-Valin | |
| 20 | 5,2 | 16,8 | 11,6 |
| 5,6 | 4,1 | 9,6 | 5,5 |
| 20 | 4,8 | 16,6 | 11,8 |

Tabelle 2. Wirkung des Sauerstoffdrucks auf den Abbau von $m/100$ -d,l-Alanin durch Schnitte von überlebendem Rattennierengewebe. 37,5°. Q_N = cmm Aminostickstoff, verbraucht von 1 mg Nierengewebe (Trockengewicht) in 1 Stunde.

| Vol. % O_2 | 20 | 4,4 | 0 |
|--------------|-----|-----|---|
| Q_N | 8,2 | 4,9 | 0 |

— 5 —

Wie Tabelle 2 zeigt, ist bei einem Sauerstoffdruck von 33,4 mm Hg (4,4 Vol.-%) der Abbau von $m/100$ -d,l-Alanin gegenüber dem in Luft um 40% gehemmt.

Die Hemmung der Desaminierung von d,l-Alanin, d,l-Valin, d,l-Leucin durch verminderten Sauerstoffdruck war von der gleichen Größenordnung, ob die Gewebsschnitte in Bicarbonat/Kohlensäure oder Phosphat enthaltenden Suspensionslösungen untersucht wurden. Die Hemmung war unabhängig von Änderungen der Wasserstoffionenkonzentration zwischen p_H 6,5 und p_H 8,2. Versuche mit Suspensionen von isolierten Nierenzellen, deren Struktur durch einstündiges Schütteln bei 37,5° in Stickstoff zerstört worden war¹³, ergaben ebenfalls eine starke Abhängigkeit der Desaminierungsgeschwindigkeit vom Sauerstoffdruck³⁵. Doch verlieren Zellsuspensionen sowohl ihre desaminotische Wirksamkeit als auch ihre Empfindlichkeit gegen Veränderungen des Sauerstoffdrucks ungleich schneller als Schnitte von intaktem Nierengewebe.

Die Kurve der Desaminierungsgeschwindigkeit in der Niere verläuft ähnlich wie die Sauerstoffsättigungskurve des Hämoglobins mit steilem Abfall bei Sauerstoffpartialdrücken unter 50 mm Hg (6,6 Vol.-%). Bei Steigerung des Sauerstoffdrucks oberhalb 100 mm Hg (13 Vol.-%) ist die Zunahme der Desaminierungsgeschwindigkeit unbeträchtlich. Das erklärt, warum Krebs in seinen grundlegenden Arbeiten über Aminosäurenstoffwechsel die entscheidende Bedeutung des Sauerstoffdrucks für die Geschwindigkeit der Desaminierung in der Niere übersehen konnte: Krebs hat die Sauerstoffabhängigkeit der Alaninoxidation in Nierenextrakten untersucht³⁴, hat aber den Sauerstoffdruck lediglich oberhalb des Maximalsauerstoffdrucks im Körper variiert und deshalb als größten Effekt bei Steigerung des Sauerstoffdrucks von 152 mm Hg (20 Vol.-%) auf 760 mm Hg (100 Vol.-%) nur eine Steigerung der Desaminierungsgeschwindigkeit von 11% erhalten.

Die vorliegenden Versuche zeigen die Geschwindigkeit der Desaminierung und Ammoniakkbildung in der Niere als eine Funktion des Sauerstoffdrucks, gerade bei den Sauerstoffdrücken, wie sie unter physiologischen und pathologischen Bedingungen in der Niere vorkommen. Unter physiologischen Bedingungen mag dies ein Mechanismus sein, der die Nierenzelle befähigt, durch Variierung des Sauerstoffdrucks, das heißt durch Vermehrung oder Verminderung des Blutzustroms, die Größe der Ammoniakkbildung zu regulieren. Unter pathologischen Bedingungen ist diese Verminderung des Sauerstoffdrucks und damit der Ammoniakkbildung „ungewollt“. Doch machen es unsere Versuche verständlich, warum auch diese „ungewollte“, durch verschiedene Krankheitsursachen „erzwungene“ Verminderung der Ammoniakkbildung in der Niere bisweilen als eine *reversible* Störung auftritt. Kommt es z. B. auf der Grundlage eines dekompen-

— 6 —

sierten Herzfehlers zu einer Stauungsniere, so wird durch die ungenügende Blutzufuhr und Verringerung der Diffusionsgeschwindigkeit im Nierengewebe der Sauerstoffdruck sinken, und mit ihm die Geschwindigkeit der Desaminierung und Ammoniakbildung; es entsteht das Krankheitsbild der renalen Acidose. Wird mit der Kompensation des Herzens der optimale Sauerstoffdruck in der Niere wiederhergestellt, so verschwindet gleichzeitig die Acidose. Eine restitutio ad integrum der Nierenfunktion tritt ein, und anatomisch-pathologische Untersuchungen ergeben keinerlei histologische Nierenveränderungen, aus denen man die einmal durchgemachte renale Acidose erkennen könnte.

Der Befund einer reversiblen Hemmung der Desaminierung der Aminosäuren in der Niere durch verminderten Sauerstoffdruck mag auch eine Erklärung geben für den Mechanismus der reversiblen Blutharnstoffvermehrung bei vorübergehender Niereninsuffizienz. Neben der Leber ist die Niere der Hauptort der Desaminierung der Aminosäuren im Körper. In der Niere ist das Endprodukt der Desaminierung Ammoniak, in der Leber Harnstoff. Wie KREBS¹³ gezeigt hat, ist die Geschwindigkeit der Desaminierung zahlreicher Aminosäuren (d,l-Alanin, d,l-Valin, d,l-Leucin, d-Ornithin, d-Lysin u. a.) in der Niere sogar 5—20mal so groß wie in der Leber. Fällt die Niere als Ort der Desaminierung aus, so wird auch der Teil der Aminosäuren, der von der gesunden Niere in Ammoniak umgesetzt wurde, der Leber zur Desaminierung angeboten und erscheint nun als Harnstoff, so daß, wenn nur die gleiche Menge Harnstoff wie unter normalen Bedingungen im Urin ausgeschieden wird, der Harnstoff im Blute ansteigen muß, ebenfalls als eine Folge der reversibel gehemmten *chemischen* — nicht der *sekretorischen* — Leistungen der Niere.

Literatur: ¹ VON BERGMANN, Funktionelle Pathologie. Berlin 1932. — ² WALTER, Naunyn-Schmiedeberg's Arch. 7, 148 (1877). — ³ HALLERVORDEN, Naunyn-Schmiedeberg's Arch. 12, 237 (1880). — ⁴ CORANDA, Naunyn-Schmiedeberg's Arch. 12, 76 (1880). — ⁵ GAETHGENS, Hoppe-Seyler's Z. 4, 36 (1880). — ⁶ STADELMANN, Naunyn-Schmiedeberg's Arch. 17, 420 (1883). — ⁷ MINKOWSKI, Naunyn-Schmiedeberg's Arch. 18, 37 (1884). — ⁸ WINTERBERG, Hoppe-Seyler's Z. 25, 202 (1898). — ⁹ HENDERSON u. PALMER, J. of biol. Chem. 17, 305 (1914); 21, 35 (1915). — ¹⁰ MUENZER, BEGUN u. HERMANN, Biochem. Z. 71, 255 (1915). — ¹¹ HASSELBALCH, Biochem. Z. 74, 16 (1916). — ¹² NASH u. BENEDICT, J. of biol. Chem. 48, 463 (1921); 51, 183 (1922). — ¹³ KREBS, Hoppe-Seyler's Z. 217, 191 (1933). — ¹⁴ VAN SLYKE c. s., J. Clin. Invest. 2, 225 (1926). — ¹⁵ RABINOVITCH, Canad. med. Assoc. J. 13, 742 (1923). — Arch. int. Med. 33, 394 (1924). — ¹⁶ MAGNUS-LEVY u. SIEBERT, Z. klin. Med. 107, 197 (1928). — ¹⁷ VOLHARD, Handbuch der Inneren Medizin 6. Berlin 1931. — ¹⁸ KEMPNER u. PESCHEL, Z. klin. Med. 114, 439 (1930). — ¹⁹ OPPENHEIMER, Die Fermente. Leipzig 1925. — ²⁰ WARBURG, Erg. Physiol. 14, 264 (1914). — ²¹ WARBURG u. KUBOWITZ, Biochem. Z. 214, 5 (1931). — ²² WARBURG, KUBOWITZ u. CHRISTIAN, Biochem. Z. 242, 170 (1931). — ²³ LEINER, Biochem. Zt.

— 7 —

276, 186 (1935). — ²⁴ MEYERHOF, Chemische Vorgänge im Muskel. Berlin 1930. — ²⁵ KEMPNER, Proc. Soc. exper. Biol. a. Med. 35, 148 (1936). — ²⁶ SCHLAYER, J. Bacter. 31, 181 (1936). — ²⁷ KEMPNER, J. cellul. a. comp. Physiol. 10, 339 (1937). — ²⁸ SCHLAYER, Biochem. Z. 293, 94 (1937). — ²⁹ NEUBAUER, Dtsch. Arch. klin. Med. 95, 211 (1901) — Handbuch der normalen und pathologischen Physiologie 5, 671 (1928). — ³⁰ KNOOP, Der Abbau aromatischer Fettsäuren im Tierkörper. Freiburg i. Br. 1904 — Oxydationen im Tierkörper. Stuttgart 1931. — ³¹ WARBURG, Stoffwechsel der Tumoren. Berlin 1926. — ³² VAN SLYKE u. DILLON, Proc. Soc. exper. Biol. a. Med. 34, 362 (1936). — ³³ SCHLAYER, Biochem. Z. Im Druck. — ³⁴ KREBS, Biochemic. J. 29, 1620 (1935). — ³⁵ KEMPNER, Proc. amer. Physiol. Soc. 50, 117 (1938) — J. of biol. Chem. 124, 229 (1938).

***Anoxemia of the Kidney as a Cause of Uremic Acidosis:
Inhibitory Effect of Low Oxygen Tension on the
Deamination of Amino Acids in Kidney Tissue***

ANOXEMIA OF THE KIDNEY AS A CAUSE OF UREMIC
ACIDOSIS: INHIBITORY EFFECT OF LOW OXYGEN TEN-
SION ON THE DEAMINATION OF AMINO ACIDS
IN KIDNEY TISSUE

BY

WALTER KEMPNER

From the Department of Medicine, Duke University, Durham, N. C.

REPRINTED FROM THE AMERICAN JOURNAL OF PHYSIOLOGY
Vol. 123, No. 1, July, 1938

PROCEEDINGS OF THE AMERICAN PHYSIOLOGICAL SOCIETY,
Baltimore, Md., 1938

Reprinted from THE AMERICAN JOURNAL OF PHYSIOLOGY
Vol. 123, No. 1, pp. 117-118, July, 1938

Anoxemia of the kidney as a cause of uremic acidosis: Inhibitory effect of low oxygen tension on the deamination of aminoacids in kidney tissue.

WALTER KEMPNER (introduced by F. D. McCrea). Department of Medicine, Duke University, Durham, N. C.

The rate of deamination of d,l-alanine, d,l-valine, d,l-leucine in surviving intact kidney tissue and in kidney extracts was measured manometrically by the Warburg method at various oxygen tensions. The deamination rate proved markedly inhibited by oxygen tensions below 8 Vol. per cent. In intact tissue slices the deamination rate of d,l-alanine, e.g., was inhibited at 5.4 Vol. per cent oxygen by 60 per cent, in kidney cell residues at 3.4 Vol. per cent oxygen by 49 per cent as compared with the deamination rate in air. The inhibitory effect of lowered oxygen tension on deamination was found in tissue slices and extracts whether the suspension medium was phosphate or CO₂-bicarbonate solution. It was independent of pH changes (m/30 phosphate) between 6.8 and 8.1. The inhibition of deamination by lowered oxygen tension was entirely reversible.

These experiments show that cessation of the chemical function of the kidney is not necessarily due to anatomical destruction but can be caused by a temporary change of the gas concentration in the cell environment. Lowered oxygen tension in the kidney reduces the aminoacid deamination with corresponding ammonia formation to a fraction of the normal rate. The aminoacid deamination being the main source of urine ammonia (Krebs), renal anoxia leads to disturbance of the acid-base equilibrium in the body: Blood and tissue acids reaching the kidney as sodium salts and normally converted there into ammonia salts, are now, due to the inhibited renal ammonia production, excreted into the urine as sodium salts; the blood bicarbonate drops, uremic acidosis ensues. But since the inhibition of deamination of aminoacids by lowered oxygen tension is a reversible reaction, the original rate of ammonia production is reestablished with the rise of the oxygen tension to its physiological level. Transient uremic acidosis is thus explained as a result of the reversible inhibition of the deamination of aminoacids in states of renal anoxemia.

***Inhibitory Effect of Low Oxygen Tension on the
Deamination of Amino Acids in the Kidney***

INHIBITORY EFFECT OF LOW OXYGEN TENSION ON
THE DEAMINATION OF AMINO ACIDS
IN THE KIDNEY

By WALTER KEMPNER

*(From the Department of Medicine, Duke University School of Medicine,
Durham, North Carolina)*

REPRINTED FROM
THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY
VOL. 124, No. 1, JUNE, 1938

Reprinted from THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY
Vol. 124, No. 1, June, 1938

INHIBITORY EFFECT OF LOW OXYGEN TENSION ON THE DEAMINATION OF AMINO ACIDS IN THE KIDNEY

By WALTER KEMPNER

(From the Department of Medicine, Duke University School of Medicine,
Durham, North Carolina)

(Received for publication, February 10, 1938)

In previous experiments we found the respiration of isolated cells (human and animal red and white blood cells and bacteria) to be very dependent on variations of oxygen tension (1, 2); *e.g.*, the respiration of leucemic blood cells at an oxygen tension of 40 mm. of Hg was inhibited by 64 per cent as compared with the respiration in air. The effect of oxygen tension on respiration was markedly altered by changes in pH, salt content, and temperature.

This paper deals with the effect of oxygen tension on the deamination of amino acids. As Neubauer (3) and Knoop (4) have shown, *oxidative* deamination is practically the only reaction by which the animal organism carries out the deamination of amino acids. Krebs (5) has shown that the site of deamination of amino acids is not only the liver but also the kidney, where the rate of deamination is even markedly greater; *e.g.*, that of *dl*-alanine 5 times as great as in the liver.

We have examined the influence of oxygen tensions between 15 and 760 mm. of Hg on the deamination of *dl*-alanine, *dl*-valine, and *dl*-leucine in surviving kidney cells. We found a very marked dependence of the rate of deamination of these amino acids on variations of oxygen tension below 60 mm. of Hg; *i.e.*, at those oxygen tensions that actually occur under physiological and pathological conditions in the body. In intact kidney slices the rate of deamination of *dl*-alanine (0.05 M), *e.g.* at an oxygen tension of 41 mm. of Hg, was inhibited by 56 per cent as compared with the rate of deamination in air.

230 Deamination of Amino Acids in Kidney

The curves of the rate of deamination of *dl*-alanine, *dl*-valine, and *dl*-leucine in the kidney show—not unlike the oxygen saturation curve of hemoglobin at 37.5°—a steep drop at oxygen tensions below 60 mm. of Hg, whereas on variations of oxygen tension between 60 and 760 mm. of Hg there was only a negligible change in the rate of deamination. This explains why Krebs in his extensive work on amino acid metabolism has overlooked the important rôle of oxygen tension for the rate of deamination. Krebs has examined (5) the dependence of *dl*-alanine ($M/23$) oxidation on oxygen tension in kidney extracts, but since he has varied the oxygen tension only above 160 mm. of Hg (from 160 to 760 mm. of Hg), the maximal effect he could find was an increase of the rate of deamination of only 11 per cent. We found in suspensions of kidney cell fragments at an oxygen tension of 25.8 mm. of Hg the rate of deamination of *dl*-alanine (0.05 M) inhibited by 49 per cent, at an oxygen tension of 18.2 mm. of Hg the rate of deamination of *dl*-valine ($M/24$) inhibited by 65 per cent, as compared with the rate of deamination in air.

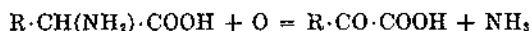
EXPERIMENTAL

There are two main difficulties in measuring the oxygen consumption due to deamination in kidney tissue. In the first place, intact kidney slices have a very high rate of respiration even in a medium which does not contain any nutrient substances. Various amino acids (glycocoll, *dl*-valine, *dl*-leucine, *d*-lysine, *dl*-serine, and others) produce only a slight increase in oxygen consumption or none at all (5); secondly, if there is a definite increase as after the addition of *dl*-alanine, *d*-glutamic acid, or *dl*-proline, in intact tissue slices, this oxygen plus-consumption is not directly proportional to the oxygen consumption in deamination as such, but partly caused by the subsequent oxidation of the keto acids formed in deamination. To avoid these difficulties Krebs (5) has inhibited the respiration by poisoning the kidney cells with cyanide or with arsenious acid or by destroying the cell structure and working with suspensions of the residual cell fragments. He found that under these conditions the increased oxygen consumption after addition of amino acids corresponds directly to the rate of deamination, 2 molecules of keto acids and 2 molecules of am-

W. Kempner

231

monia appearing for 1 molecule of oxygen consumed, as postulated by Neubauer's equation,



We have worked with suspensions of cell fragments as well as with intact tissue slices whose respiration had been inhibited by a preliminary period of anaerobiosis. The respiration of tissue slices which were shaken for 1 hour in a nitrogen atmosphere at 37.8° was found to be inhibited by 70 per cent, and no increase of oxygen consumption took place after keto acid was added (pyruvic acid), whereas on addition of amino acids a marked increase in oxygen consumption occurred. The oxygen consumption was measured by the Warburg method (6). The material used was rat kidney. In the experiments with intact tissue particular care was taken to work with slices of "optimal limiting thickness." Only slices of about 0.05 mm. thickness were used. The thickness is determined by the quotient, volume to surface area, the volume being assumed as 5 times the dry weight of the tissue slice (6). Four slices of approximately equal size (dry weight 3 to 4 mg.) were placed in manometer vessels, each containing 6 cc. of 0.9 per cent NaCl and *m*/60 phosphate (pH 7.4) solution. The vessels were saturated with nitrogen and shaken in the thermostat at 37.8° for 1 hour. After that time the slices were washed in NaCl-phosphate solution and replaced in vessels of about 18 cc. capacity, containing 2 cc. of 0.9 per cent NaCl and *m*/60 phosphate (pH 7.4) in the main space, and 0.2 cc. of 10 per cent KOH in the side bulb. When the suspension medium was Ringer-bicarbonate solution (0.025 *M*), Warburg's "two vessel method" (6) was used, one of the vessels containing 6 cc., the other 2 cc. of suspension fluid. The amino acids were added either in substance or in solution (0.1 to 0.2 cc.), so that the final concentration of the suspension fluid was *m*/20 to *m*/24. The temperature in the thermostat was 37.8°, the shaking speed 165 oscillations per minute. Increase of the shaking speed did not alter the results. The respiration of the kidney cells was measured in three 30 minute periods, first in air, then at higher or lower oxygen tensions, and again in air. The gas mixtures were mixtures of oxygen and nitrogen of various concentrations, containing, when Ringer-

232 Deamination of Amino Acids in Kidney

bicarbonate suspensions were used, 5 per cent carbon dioxide; they were prepared over mercury. Each vessel was saturated with 1 liter of gas while being shaken in the thermostat. Readings were made every 5 minutes without stopping the manometers.

Table I shows the effect of oxygen tension on the oxidation of *dl*-alanine (0.05 M) in kidney slices. The rate of deamination at an oxygen tension of 41 mm. of Hg (oxygen concentration of 5.4 volumes per cent) is inhibited by 56 per cent, compared with the rate of deamination in air. After the oxygen concentration is changed from 5.4 volumes per cent back to 20 volumes per cent, the rate of alanine oxidation rises again to the same value as be-

TABLE I

Effect of Oxygen Tension on Oxidation of dl-Alanine (0.05 M) in Slices of Kidney Tissue

Temperature, 37.8°. QO_2 = c.mm. of oxygen consumed in 1 hour by 1 mg. of kidney tissue (dry weight).

| Oxygen tension <i>mm. Hg</i> | QO_2 , total oxygen consumption | | QO_2 , oxygen consumed in oxidation of <i>dl</i> - alanine (3) - (1) |
|-------------------------------------|--|--|---|
| | NaCl-phosphate without alanine (1) | NaCl-phosphate- <i>dl</i> -alanine (2) | |
| 152 | 6.4 | 18.5 | 12.1 |
| 41 | 4.5 | 9.9 | 5.4 |
| 152 | 5.4 | 17.9 | 12.5 |

fore the period of low oxygen tension. About the same inhibition of the rate of deamination at the same oxygen tension was found for the deamination of *dl*-valine (0.05 M) and *dl*-leucine (M/24).

Previous experiments (1) had shown that the respiration of nucleated blood cells was influenced by low oxygen tension only when the cells were examined in their physiological bicarbonate-CO₂-containing milieu. When the cells were suspended in phosphate, the respiration was insensitive to changes in oxygen tension, whereas the respiration of numerous bacteria (1, 2) proved to be sensitive to variations of oxygen tension in phosphate as well as in CO₂-bicarbonate solutions. To determine the influence of the salt content on the effect of low oxygen tension on deamination, about equal amounts of kidney slices of the same rat were

W. Kempner

233

examined in NaCl-phosphate and NaCl-bicarbonate-CO₂ of the same pH. No difference was found in the sensitivity of the rate of deamination towards variations of oxygen tension whether the suspension medium was bicarbonate-CO₂ or phosphate.

The influence of pH changes on the effect of low oxygen tension on deamination was determined by suspending the tissue slices in M/30 phosphate solutions of pH 6.8 to 8.2, the substrate being 0.05 M *dl*-alanine. Within this range of pH the magnitude of the effect of variations of oxygen tension on the rate of deamination was found to be the same throughout.

It has been emphasized before (7, 2) that in experiments with tissue slices under conditions of lowered oxygen tension the fact must be considered that insufficient gas diffusion cannot be excluded as a limiting factor with the same certainty as in experiments with isolated cells or with suspensions of cell fragments, so that there is the probability of the actual oxygen tension at the surface of each single cell being lower than that at the surface of the tissue slice or in the gas space surrounding it. Nevertheless it is improbable that in slices of 0.05 mm. thickness so much oxygen should be lost on the way from the surface of the slice to the central cell layers that more than half of the cells are subjected to complete anaerobiosis. To exclude entirely the factor of diffusion, however, a series of experiments was made with suspensions of cell fragments. Although the "amino acid-oxidodeaminase" is not stable, after the cell structure is broken up, and loses its activity after a short time (5), suspensions of cell fragments are still suitable material for this kind of experiment, since observation periods of 30 to 60 minutes are sufficient for measuring the rate of deamination at various oxygen tensions.

100 to 200 mg. (dry weight) slices of rat kidney were shaken at a shaking speed of 200 oscillations per minute in 5 to 7 cc. of 0.9 per cent NaCl and M/60 phosphate (pH 7.4) under anaerobic conditions at 37.8° for 1 hour. After this time the slices were taken out, 1 cc. of the remaining suspension fluid containing about 10 to 12 mg. of cell fragments was pipetted into each of 4 to 6 manometer vessels of about 18 cc. capacity with 0.2 cc. of 10 per cent KOH in the side bulb, and the oxygen uptake measured simultaneously at various oxygen tensions in the presence and absence of amino acids.

234 Deamination of Amino Acids in Kidney

Table II shows the rate of oxidation of *dl*-valine in suspensions of cell fragments at oxygen tensions of 152, 30.4, and 18.2 mm. of Hg (oxygen concentrations of 20, 4, and 2.4 volumes per cent) with a marked dependence of the deamination on variations of oxygen tension. The absolute rate of oxidation of valine, calculated per mg. of dry weight of cell fragments, appears to be hardly less in these suspensions than in intact tissue slices during the first 30 minutes (11.42 against 13.20 c.mm. of O₂). There is a considerable drop, however, in the second 30 minutes (from 11.42 to 6.08 c.mm. of O₂), while the rate of oxidation in intact kidney slices remains approximately constant for 3 to 4 hours. With the decrease of the absolute rate of deamination there is also a de-

TABLE II
Effect of Oxygen Tension on Oxidation of dl-Valine (0.05 M) in Suspensions of Kidney Cell Fragments

Temperature, 37.8°. QO₂ = c.mm. of oxygen consumed in 1 hour by 1 mg. of kidney cell fragments (dry weight).

| | Oxygen tension, mm. Hg | | | | | | | | |
|---------------------------------|------------------------|---------------|-----------|------|---------------|--------------|------|---------------|--------------|
| | 152 | | | 30.4 | | | 18.2 | | |
| | (1) | Valine (2) | (2) - (1) | (3) | Valine (4) | (4) - (3) | (5) | Valine (6) | (6) - (5) |
| QO ₂ , first 30 min. | 2.86 | 14.28 | 11.42 | 2.56 | 7.70 | 5.14 | 2.27 | 6.20 | 3.93 |
| " second 30 " | 1.60 | 7.68 | 6.08 | 1.37 | 5.95 | 4.58 | 1.35 | 4.80 | 3.45 |

crease of the sensitivity of the rate of deamination towards variations of oxygen tension. In the first 30 minutes the rate of deamination of *dl*-valine in suspensions of cell fragments at an oxygen tension of 30.4 mm. of Hg is inhibited by 55 per cent, at an oxygen tension of 18.2 mm. of Hg by 65 per cent, as compared with the rate of deamination in air. In the second 30 minutes the inhibition is only 24 per cent at an oxygen tension of 30 mm. of Hg and 43 per cent at an oxygen tension of 18.2 mm. of Hg. After 100 to 120 minutes the absolute rate of deamination has fallen to minimal values; the inhibitory effect of lowered oxygen tension on the rate of deamination has ceased entirely. This loss of sensitivity towards changes in oxygen tension occurs still more rapidly in further purified extracts.

W. Kempner

235

The dependence of *dl*-alanine and *dl*-leucine oxidation on variations of oxygen tension was found to be of the same magnitude as the sensitivity of the valine oxidation. For all three amino acids the results were the same whether suspensions containing NaCl-phosphate or NaCl-bicarbonate-CO₂ were used. As in intact tissue slices, also in suspensions of cell fragments, a marked effect of oxygen tension on deamination was found within a wide range of pH (M/30 phosphate, pH 6.8 to 8.2).

SUMMARY

The rate of deamination of *dl*-alanine, *dl*-valine, and *dl*-leucine in intact kidney tissue and in suspensions of kidney cell fragments was measured manometrically by the Warburg method at various oxygen tensions. The rate of deamination was found to be markedly inhibited by oxygen tensions below 60 mm. of Hg. In intact tissue slices the rate of deamination of *dl*-alanine (0.05 M), for example, was inhibited by 56 per cent at an oxygen tension of 41 mm. of Hg, in suspensions of kidney cell fragments at an oxygen tension of 25.8 mm. of Hg by 49 per cent, as compared with the rate of deamination in air. The inhibition of deamination by lowered oxygen tension is entirely reversible.

The inhibitory effect of lowered oxygen tension on deamination was found in tissue slices and suspensions of cell fragments, whether the suspension fluid was phosphate or CO₂-bicarbonate solution.

In intact kidney slices and in suspensions of cell fragments, the effect of low oxygen tension on deamination was independent of pH changes (M/30 phosphate) between 6.8 and 8.2.

BIBLIOGRAPHY

1. Kempner, W., *Proc. Soc. Exp. Biol. and Med.*, **35**, 148 (1936); *J. Cell. and Comp. Physiol.*, **10**, 339 (1937).
2. Schlager, C., *Biochem. Z.*, **293**, 94 (1937); *J. Bact.*, **31**, 181 (1936).
3. Neubauer, O., *Deutsch. Arch. klin. Med.*, **95**, 211 (1901); in Bethe, A., von Bergmann, G., Embden, G., and Ellinger, A., *Handbuch der normalen und pathologischen Physiologie*, Berlin, **5**, 671 (1928).
4. Knoop, F., *Der Abbau aromatischer Fettsaeuren im Tierkoerper*, Freiburg (1904); *Oxydationen im Tierkoerper*, Stuttgart (1931).
5. Krebs, H. A., *Z. physiol. Chem.*, **217**, 191 (1933); *Biochem. J.*, **29**, 1620 (1935).
6. Warburg, O., *Stoffwechsel der Tumoren*, Berlin (1926).
7. Lohmann, R., *Klin. Woch.*, **39**, 1799 (1931).

Biologie der Entzündung
[Biology of Inflammation]

Biology of Inflammation by Ruth Lohmann

The nature of the inflammatory process, like that of many other pathologic processes, was elucidated in the century of cellular anatomy by means of histologic-morphologic findings. But clinical medicine requires a knowledge not only of anatomical pathology—the changes in cell appearance and composition occurring in disease—but also of functional pathology, as defined by G. v. Bergmann. With respect to the physiology of inflammation, what physical-chemical reactions occur as a result of anatomically observed cellular changes, and how do these reactions, in turn, affect life? The anatomy of inflammation describes the symptoms of stasis, cell immigration, and loss of function; the physiology of inflammation has to explain by what laws the stasis and cell immigration necessarily lead to a loss of function of the particular organ. The task of this paper is to investigate the problem of inflammation from the point of view of cellular physiology.

Two chemical reactions are the essential sources of energy for human body cells: respiration—oxidation of fat, protein, and carbohydrates—and glycolysis, the cleavage of sugar into lactic acid. Respiration and glycolysis are not mutually independent reactions, but rather are linked together by the Pasteur reaction. This means that, as Kempner has found, when optimal oxygen supply is present (“aerobic glycolysis”) then both respiration and glycolysis are dependent on the oxygen pressure and thus can be regulated indirectly. However, the oxygen compound of the respiration enzyme dissociates at much higher oxygen pressures than the oxygen compound of the fermentation enzyme, so that reduction of oxygen pressure can severely inhibit respiration before any fermentation appears. This fermentation, *la vie sans oxygene* (“life without oxygen”—Pasteur), occurs in healthy animal body cells, in general only at minimal oxygen pressure (“anaerobic glycolysis”).

The aerobic glycolysis of dying body cells plays a central role in the physiology of inflammation, since the so-called inflammatory cells, the blood and exudate leukocytes, are metabolically dying body cells. In his study of the metabolism of immature leukocytes, Peschel pursued the premise that if the aerobic glycolysis of the older “mature” blood cells is caused only by damage or dying, then younger leukocytes (like the white cells passing from their formation sites into the blood path in lymphatic leukemia) should not exhibit this aerobic glycolysis, but rather would behave metabolically like normal body cells. Peschel was able to demonstrate this in four cases of lymphatic leukemia: The young blood cells, the leukemic lymphocytes, exhibited no aerobic glycolysis (in contrast to the mature blood cells, e.g., the blood and exudate leukocytes), thus their metabolic behavior is by no means like that of

tumor cells or dying body cells. These metabolic properties—purely oxidative metabolism in young, “immature” blood cells and for all other normal body cells, and aerobic glycolysis in older, “mature” blood cells as in damaged body cells—are to be observed not only for the lymphatic but also for the myeloic cells.

The metabolism of the inflammatory cells, as was shown, is a damaged metabolism of dying body cells with large respiration and aerobic glycolysis. From the standpoint not of the biology of white blood cells but rather of the milieu in which these cells are living, i.e., respiring and cleaving, what specific changes do these inflammatory cells produce at the site of the inflammation? They produce a decrease in oxygen pressure, sugar and bicarbonate content, increased lactic acid, and decreased pH.

Thus the anatomical and chemical changes at the site of the inflammation remain the necessary theoretical and experimental basis, not only of an isolated organ pathology and cellular pathology but also of all processes in the organism occurring in conjunction with an inflammation. For cell physiologists a question arises from the finding that inflammation fundamentally changes the physical chemistry of the inflamed area: How do cells—body cells and others—behave under conditions of inflammation, or in a milieu with changed oxygen, carbonic acid, sugar, bicarbonate content, and pH? To answer this we measured the respiration and fermentation of “normal” and “damaged” body cells, cancer cells, and bacteria under the conditions of inflammation. Isolated muscle was studied to establish how conditions of inflammation change not only cell metabolism but also cell function.

For example, we placed sections of the same kidney tissue for one hour under aerobic and anaerobic conditions in body-temperature Ringer's solution, then placed both tissues into fresh Ringer's solution and measured their metabolism under aerobic conditions. The respiration of the anaerobic tissue was zero, whereas the respiration of the aerobic tissue had hardly decreased in comparison to the first half-hour. This shows that one hour of anaerobiosis is sufficient to damage the kidney tissue significantly. The level of damage due to anaerobiosis is dependent on the duration of the exposure and on the sensitivity of the affected tissue. (The retina, for example, is more sensitive than liver tissue; organs of warm-blooded animals are more sensitive than those of cold-blooded animals.)

The sugar concentration of the milieu had no effect on the respiration of the kidney tissue at concentrations between 10 and 200 mg in 100 cc of fluid. In Ringer's solution with a sugar content of 0, the respiration of the kidney tissue measured over several hours was approximately 30-50% less than at a sugar content of 0.2%.

The metabolism of normal body cells under conditions of inflammation, i.e., reduction in sugar, bicarbonate content, and pH, differs little from the metabolism of normal body cells under physiologic conditions. Normal body cells show significant metabolic change only if there is a considerable drop in oxygen pressure, i.e., in the later stage of an inflammation, with exclusion of oxygen from the inflammatory area.

No formation of lactic acid is found in a muscle at rest; the ratio of carbonic acid/oxygen is less than 1. If we let the muscle operate at maximum, then lactic acid is formed, even though the muscle is acting in a pure oxygen atmosphere.

It could be established as a rule for cellular metabolism that, under the conditions of deficient sugar and bicarbonate and in acidic pH, the respiration remains constant while the aerobic glycolysis is very significantly dependent on these conditions. This dependence of glycolysis was demonstrated in cells that are either damaged within the body or are dying off from damage outside the body, for example, from an experimentally induced injury. In normal body cells under physiologic conditions aerobic glycolysis does not occur.

Thus, as the physiology of the muscle shows, changes in the physical-chemical milieu due to fatigue of muscle after excessive work are the same as changes that occur in the metabolism of inflammation. What the exudate leukocytes bring about in inflammation by aerobic glycolysis is brought about in fatigue of muscle by the aerobic glycolysis of the over-taxed muscle cell. The two states inflammation and fatigue have in common that they make it impossible for the cell to obtain energy through cleavage of sugar. With this damage to the glycolytic capacity, the muscle also loses its ability to contract and to work.

According to these findings, on the one hand inflammation provides the body a means to kill the degenerated cells of malignant tumors; on the other hand, the result of reduced inflammatory response of the body favors the generation of cancer and the uninhibited growth of degenerate cells.

It is clear that, solely according to the laws of energy requirements, inflammation will cause the "death" of most bacteria. The majority of bacteria live by respiration or sugar cleavage or by both reactions in tandem; thus they can neither grow nor exert their harmful effects on the body, when these energy-supplying reactions (which supply the requisites for the activity of all living beings) are interrupted.

ZEITSCHRIFT FÜR KLINISCHE MEDIZIN

HERAUSGEGEBEN VON

H. ASSMANN-KÖNIGSBERG · G. VON BERGMANN-BERLIN · TH. BRUGSCH
BERLIN · M. BÜRGER-LEIPZIG · E. EDENS-DÜSSELDORF · H. EPPINGER
WIEN · C. HEGLER-HAMBURG · G. KATSCH-GREIFSWALD · F. KÜLS
KÖLN · C. VON NOORDEN-WIEN · V. SALLE-BERLIN · A. SCHITTENHELM
MÜNCHEN · R. SIEBECK-BERLIN · R. STAEHELIN-BASEL · W. STEPP
MÜNCHEN · F. VOLHARD-FRANKFURT A.M.

REDIGIERT VON

G. VON BERGMANN UND V. SALLE

Sonderabdruck aus 135. Band. 3. Heft

Ruth Lohmann:
Biologie der Entzündung



BERLIN
VERLAG VON JULIUS SPRINGER

1938

Z. klin.
Med.

(Aus der II. Medizinischen Klinik der Charité, Berlin.
[Direktor: Prof. Dr. G. v. Bergmann].)

Biologie der Entzündung.

Von

Ruth Lohmann.

Mit 13 Textabbildungen.

(Eingegangen am 12. Oktober 1938.)

Die Frage nach dem Wesen der Entzündung wurde im Jahrhundert der Zellularanatomie wie beinahe jede Frage nach dem Wesen irgendeines pathologischen Prozesses mit histologisch-morphologischen Feststellungen beantwortet. Am gefärbten oder ungefärbten, am frischen oder fixierten Präparat wurden für die verschiedenen Formen und Stadien der Entzündung charakteristische anatomische Veränderungen nachgewiesen: Im Beginn einer Entzündung die Erweiterung der kleinen Gefäße, die arterielle Hyperämie, die vermehrte Blutdurchströmung — auf dem Höhepunkt der Entzündung die Verlangsamung der Zirkulation bis zur Stase, die erhöhte Durchlässigkeit und Lähmung der kleinen Gefäße, die Bildung eines Exsudats und die Einwanderung der entzündlichen Zellen — als Endzustand einer Entzündung Degeneration und Absterben der geschädigten Zellen und Ersatz durch neugebildetes Gewebe. Die „Formen“ der Entzündung wurden entweder danach unterschieden, ob die einzelnen Erscheinungen in stärkerem oder geringerem Maße, ob sie nacheinander oder nebeneinander auftraten, oder nach der Art des entzündungserregenden Reizes und der Reaktionsfähigkeit des erkrankten Gewebes. Bei bakteriellen Entzündungen wurden die morphologischen Beziehungen zwischen Zellen und Bakterien untersucht, die intra- oder extrazelluläre Lage, z. B. der Kokken in den Leukocyten, das Befallensein des Zellprotoplasmas oder des Kerns.

Mit der Auffindung und Umgrenzung dieser histologischen Erscheinungen begründete die Zellularanatomie auch in der Klinik eine Lehre vom Wesen der Entzündung, die makroskopisch oder mikroskopisch die einzelnen Ereignisse eines Entzündungsablaufs trennte und in fertigen Zustandsbildern festhielt, beispielsweise der „Stase des Blutes“ oder der „Emigration entzündlicher Zellen“, ohne danach zu fragen: Was geschieht z. B. bei einer Stase, welches sind die *Wirkungen* der entzündlichen Zellen?

Die klinische Medizin bedarf aber nicht nur der Kenntnis des veränderten Zellaussehens und der veränderten Zellzusammensetzung, die bei der Erkrankung eines Organes auftreten, nicht nur der *anatomischen* Pathologie, sondern der *funktionellen* Pathologie im Sinne G. v. Bergmanns¹, d. h. bei der vorliegenden Frage der *Physiologie der Entzündung*:

Welche physikalisch-chemischen *Reaktionen* finden statt als Folge der anatomisch festgestellten cellulären Veränderungen und verändern diese Reaktionen wiederum das Leben und auf welche Weise? Die Anatomie der Entzündung beschreibt die Symptome der Stase, der Zellemigration und der *functio laesa*, die Physiologie der Entzündung hat zu erklären, nach welchen Gesetzmäßigkeiten die Stase und die Zellemigration notwendig zu einer *functio laesa* des betroffenen Organes führen.

Aufgabe dieser Arbeit ist es, das Problem der Entzündung unter solchen zellphysiologischen Gesichtspunkten experimentell anzugreifen.

Der erste, der Probleme der Pathologie unter zellphysiologischen Gesichtspunkten angegriffen hat, war *O. Warburg*² in seinen Arbeiten über den Stoffwechsel der Tumoren. Die pathologische Anatomie hatte gelehrt, an welchen *strukturellen Merkmalen* man die Zellen der bösartigen Geschwülste erkennt; *Warburg* zeigte, wie sich die Zellen der bösartigen Geschwülste in ihren elementaren *chemischen Reaktionen* von den normalen Körperzellen unterscheiden. Zur Messung dieser Zellreaktionen verwendete er die manometrischen Methoden, die es überhaupt erst ermöglichten, an überlebenden menschlichen und tierischen Körperzellen unter physiologischen Bedingungen zu experimentieren und gleichzeitig die chemischen Zelleistungen durch Beobachtung kleinster Veränderungen des Gasdrucks quantitativ festzustellen. Denn die wichtigsten Zellvorgänge sind Reaktionen, die mit einer Gasbildung oder einem Gasverbrauch verbunden sind, z. B. die Atmung mit Sauerstoffverbrauch und Kohlensäurebildung, die alkoholische Gärung mit Kohlensäurebildung, die Buttersäuregärung mit einer Bildung von Kohlensäure und Wasserstoff. Handelt es sich um Zellvorgänge, die nicht unmittelbar mit Gasreaktionen verbunden sind, so können sie durch passend gewählte Zusätze mit Gasreaktionen gekoppelt werden, z. B. kann die Milchsäurebildung aus Kohlehydraten gemessen werden an der Bildung von Kohlensäure, die frei wird, wenn sich die gebildete Milchsäure mit dem der Suspensionsflüssigkeit zugesetzten Natriumbicarbonat verbindet.

Für die menschlichen Körperzellen gelten zwei chemische Reaktionen als die wesentlichen Energiequellen: die Atmung — die Oxydation von Fett, Eiweiß und Kohlehydraten —, und die Glykolyse — die Spaltung von Zucker zu Milchsäure. Atmung und Glykolyse sind keine voneinander unabhängigen Reaktionen, sondern durch die *Pasteursche Reaktion*² in der Weise miteinander verbunden, daß bei optimaler Sauerstoffversorgung („aerobe Glykolyse“) beide, sowohl die Atmung wie die Glykolyse, wie *Kempner*³ gefunden hat, abhängig sind vom Sauerstoffdruck und auf diese Weise *mittelbar* auch einander regulieren.

Allerdings dissoziiert die Sauerstoffverbindung des Atmungsferments bei wesentlich höheren Sauerstoffdrücken als die Sauerstoffverbindung des Gärungsfermentes, so daß bei Verminderung des Sauerstoffdruckes die Atmung schon stark gehemmt sein kann, bevor noch eine Gärung

erscheint ⁴. Diese Gärung, „la vie sans oxygène“ (*Pasteur*), tritt bei gesunden tierischen Körperzellen im allgemeinen erst bei minimalen Sauerstoffdrücken auf („anaerobe Glykolyse“).

Die Möglichkeit des Auftretens einer Glykolyse besteht aber auch beispielsweise wenn, wie bei der Blausäure- und Kohlenoxydvergiftung der Zellen, Blausäure und Kohlenoxyd mit dem Atmungsferment (*Warburg* ²) und dem Gärungsferment (*Schlayer* ⁵) reversible Verbindungen eingehen. Für unser Problem steht im Vordergrund das Phänomen der irreversiblen aeroben Glykolyse im Stoffwechsel von geschädigten Körperzellen, Tumorzellen und Bakterien.

Wollte man also nur nach dem Stoffwechsel die tierischen Gewebe klassifizieren, so hätte man, unter Vernachlässigung von experimentell erzeugten Stoffwechseltypen, zwei Hauptarten zu unterscheiden: erstens die normalen wachsenden und nichtwachsenden Körperzellen mit mehr oder minder großer Atmung und *anaerober* Glykolyse, bei denen aber in Gegenwart von Sauerstoff keine Milchsäurebildung auftritt, und zweitens die absterbenden Körperzellen und die Zellen der bösartigen Geschwülste, bei denen auch bei Sauerstoffgegenwart Milchsäure gebildet wird. Doch wäre eine solche Zusammenordnung der absterbenden Körperzellen und der Tumorzellen wegen des gemeinsamen Stoffwechseltypus der aeroben Glykolyse oberflächlich; denn bei den Zellen der bösartigen Geschwülste ist die Glykolyse so groß, daß sie für die Geschwulstzellen neben der Atmung als wesentliche Energiequelle besteht und sogar noch bei vollständigem Sauerstoffabschluß und aufgehobener Atmung für Leben und Wachstum ausreichende Energiemengen liefert. Bei geschädigten normalen Körperzellen hingegen erscheint die aerobe Glykolyse nur eine relativ kurze Zeit vor dem endgültigen Tod. Leben oder gar wachsen kann eine solche geschädigte Körperzelle auch in dem Stadium der noch vorhandenen Glykolyse nicht, da die Glykolyse der normalen Körperzellen allein — bei aufgehobener oder bei geschädigter Atmung — nicht ausreicht, die für das Leben notwendige Energie zu liefern.

Für die Physiologie der Entzündung hat die aerobe Glykolyse der absterbenden Körperzellen eine zentrale Bedeutung, da die sogenannten entzündlichen Zellen, die Blut- und Exsudatleukocyten, stoffwechselmäßig solche absterbenden Körperzellen sind.

1. Stoffwechsel der entzündlichen Zellen. Die entzündlichen Zellen sind mononucleäre und polynucleäre Leukocyten, deren prozentuale Zusammensetzung schwankt, je nach Art und Stadium der Entzündung. Die entzündlichen Zellen sind also Abkömmlinge der lymphatischen und der myeloischen Reihe, ob sie nun aus dem Blut in das entzündliche Gebiet einwandern oder im entzündeten Gebiet selbst entstehen.

Der Stoffwechsel der im Blut kreisenden und der Exsudatleukocyten war untersucht worden bei Ratten, Kaninchen und Gänsen. Die verschiedenen Untersucher fanden übereinstimmend eine im Verhältnis zur

Atmung große aerobe Zuckerspaltung bei allen untersuchten Leukocyten. Bakker⁷ hat daraus den Schluß gezogen, daß der Stoffwechsel der Leukocyten sich nicht vom Stoffwechsel der bösartigen Geschwülste unterscheidet, die aerobe Glykolyse also keine spezifische Eigenschaft der Tumorzellen darstelle. Warburg und Fleischmann⁷ haben das Auftreten der aeroben Glykolyse der weißen Blutzellen damit erklärt, daß die weißen Blutkörperchen eben wie die Erythrocyten Zellen seien, die bereits in der Blutbahn oder im Exsudat zugrunde gehen und daß bei ihnen ebenso wie bei den außerhalb des Körpers geschädigten und absterbenden Zellen die aerobe Glykolyse nur eine letzte Stoffwechselphase vor ihrem endgültigen Absterben bedeute, während das Carcinom durch die aerobe Glykolyse seines stationären Stoffwechsels für Leben und Wachstum wesentliche Energiemengen gewinnt.

Um diese Frage zu entscheiden, hat Peschel⁷ den Stoffwechsel unreifer Leukocyten untersucht, von der Überlegung ausgehend,

daß, wenn die aerobe Glykolyse der älteren, „reifen“ Blutzellen nur durch Schädigung oder Absterben bedingt sei, jüngere Leukocyten, wie die eben erst aus ihren Bildungsstätten in die Blutbahn übergetretenen weißen Zellen beispielsweise der lymphatischen Leukämie, diese aerobe Glykolyse nicht zeigen dürften, sondern sich stoffwechselmäßig wie normale Körperzellen verhalten müßten. Dies konnte Peschel an 4 Fällen von lymphatischer Leukämie beweisen. Die jungen Blutzellen, die leukämischen Lymphocyten, zeigten im Gegensatz zu den reifen Blutzellen, z. B. den Blut- und Exsudatleukocyten, keine aerobe Glykolyse, verhalten sich also stoffwechselmäßig keineswegs wie Tumorzellen oder absterbende Körperzellen (Tabelle 1).

Diese Stoffwechseleigenschaften — rein oxydativer Stoffwechsel bei jungen, „unreifen“ Blutzellen wie bei allen übrigen normalen Körperzellen, aerobe Glykolyse bei älteren, „reifen“ Blutzellen wie bei geschädigten Körperzellen — sind in gleicher Weise nicht nur für die lymphatischen,

Tabelle 1. Atmung und aerobe Glykolyse verschiedener Stoffwechseltypen (ungefähre Mittelwerte).

| | Q _{O₂} * Atmung | Q _M ^{O₂**} Aerobe Glykolyse |
|--|--|--|
| Normales Nierengewebe der Ratte | — 25 | + 0 |
| Geschädigtes Peritoneum der Ratte | — 4 | + 2 |
| Carcinomgewebe vom Menschen | — 5 | + 15 |
| Leukämische Lymphocyten vom Menschen | — 6 | + 0 |
| Blutleukocyten der Ratte | — 9 | + 3 |
| Exsudatleukocyten vom Menschen | — 20 | + 15 |

$$* Q_{O_2} = \frac{\text{cmm verbrauchten Sauerstoffs}}{\text{mg Gewebe} \cdot \text{Stunden}}$$

$$** Q_M^{O_2} = \frac{\text{cmm aerob gebildeter Milchsäure}}{\text{mg Gewebe} \cdot \text{Stunden}}$$

sondern auch für die myeloischen Zellen nachzuweisen. Doch wird die Untersuchung des Stoffwechsels der unreifen myeloischen Zellen dadurch besonders erschwert, daß nur bei den sehr seltenen Formen der fast reinen Myeloblastenleukämien mit hohen Zellzahlen genaue Messungen möglich sind. Denn bei hohem Myeloblastenanteil und geringer Zellzahl wird der Atmungsstoffwechsel der Myeloblasten überdeckt durch den Atmungs- und Spaltstoffwechsel der Erythrocyten, bei hoher Zellzahl und geringerem Myeloblastenanteil durch den Atmungs- und Spaltungsstoffwechsel der reifen Leukocyten. Die Trennung der reifen und unreifen Zellformen des leukämischen Blutes gelang nicht, die Trennung der weißen und roten Blutzellen durch Zentrifugieren gelingt leicht, doch wird bereits durch Zentrifugieren die Myeloblastenatmung geschädigt. Die Messung des Stoffwechsels ungeschädigter Myeloblasten kann nur geschehen in fast reinem Myeloblastenblut mit hoher Zellzahl, aus der Vene in körperwarmer Zitratlösung aufgefangen und im Thermostaten sofort mit Sauerstoff-Kohlensäure gesättigt.

Tabelle 2. Stoffwechsel von myeloischen Leukocyten bei verschiedenem Anteil an reifen und unreifen Zellen.

| | Q_{O_2} Atmung | $Q_{O_2}^M$ Aerobe Glykolyse | Verhältnis von Atmung zu aerober Glykolyse |
|--|---------------------|------------------------------------|---|
| Myeloisches Blut mit überwiegendem Anteil an Myeloblasten | — 3,2 | + 1,6 | 2 : 1 |
| Myeloisches Blut mit überwiegendem Anteil an reifen Leukocyten | — 2,07 | + 3,94 | 1 : 2 |

Durch diese methodischen Schwierigkeiten erklärt sich die Annahme von *Barron* und *Harrop*⁸, die den Stoffwechsel der weißen Blutzellen, durch Zentrifugieren gewonnen, bei lymphatischen und myeloischen Leukämien untersuchten. Die Zellen der lymphatischen und myeloischen Reihe seien wesentlich durch ihren Stoffwechsel unterschieden, bei lymphatischen Zellen sei die Atmung im Verhältnis zur Spaltung größer als bei myeloischen Zellen. Dieser von *Barron* und *Harrop* gefundene Stoffwechselunterschied beruht — abgesehen von der Schädigung durch das Zentrifugieren — lediglich auf der ungleichen Mengenverteilung der unreifen (atmenden) und reifen (atmenden und spaltenden) Zellen bei den verschiedenen Formen der Leukämie.

Tabelle 2 zeigt den Stoffwechsel leukämischer Zellen bei 2 Fällen von myeloischer Leukämie, die sich durch den verschiedenen Gehalt an reifen und unreifen Zellen unterscheiden. Bei Überwiegen der unreifen Zellen ist das Verhältnis Atmung:Spaltung wie 2:1, bei Überwiegen der reifen Zellen wie 1:2.

Ebenso wie die älteren, „reifen“ Leukocyten des Blutes verhalten sich, wie *Kempner* und *Peschel*⁶ an menschlichen Exsudatleukocyten gezeigt

haben, die sog. entzündlichen Zellen, d. h. diejenigen Zellen, die bei jedem Entzündungsprozeß, wo überhaupt von einer Zellemigration gesprochen werden kann, von der Rundzelleninfiltration bis zum Absceß, gefunden werden. Der Stoffwechsel der entzündlichen Zellen, vorwiegend polynucleärer Zellen, die in einer durch den Reiz eines Cantharidenpflasters entstehenden entzündlichen Hautblase sich ansammeln, wurde bei 30 gesunden und kranken Menschen untersucht und in allen Fällen wurde neben einer großen Atmung eine beträchtliche aerobe Glykolyse gefunden.

Daß die mononucleären Exsudatleukocyten den gleichen Stoffwechseltyp wie die polynucleären Exsudatleukocyten besitzen, also kein grundsätzlicher Unterschied zwischen den reifen Blutzellen der lymphatischen und der myeloischen Reihe besteht, demonstriert ein Fall von frisch punktiertem Ascites, der ausschließlich mononucleäre Zellen enthielt (Tabelle 3).

Tabelle 3. Stoffwechsel reifer Leukocyten der myeloischen und lymphatischen Reihe und unreifer Leukocyten.

| | Q _O , Atmung | Q _M ^O , Aerobe Glykolyse |
|--|----------------------------|--|
| Exsudatleukocyten (überwiegend polynucleäre) . . . | — 22,8 | + 16,8 |
| Exsudatleukocyten (überwiegend mononucleäre) . . | — 10,4 | + 7,9 |
| Leukämische Lymphocyten | — 5,8 | + 0 |

Die menschlichen Exsudatleukocyten, sowohl die mononucleären wie die polynucleären, verhalten sich also qualitativ stoffwechselfähig wie die tierischen Exsudat- und Blutleukocyten, sie zeigen auch bei Sauerstoffgegenwart die Zuckerspaltung geschädigter, absterbender Körperzellen. Quantitativ verhält sich allerdings der Stoffwechsel der menschlichen Exsudatzellen anders, denn sowohl ihre Atmung wie ihre aerobe Glykolyse ist beträchtlich größer als es bei den tierischen Zellen gefunden wurde. Für die Physiologie der Entzündung hat die absolute Größe der Stoffwechselzahlen keine prinzipielle Bedeutung; hingegen beeinflusst die Art des Stoffwechsels der entzündlichen Zellen entscheidend den Ablauf sämtlicher im Bereich einer Entzündung auftretenden Reaktionen.

II. *Chemische Veränderungen am Ort der Entzündung.* Betrachtet man den Stoffwechsel der entzündlichen Zellen — wie gezeigt wurde, ein Schädigungsstoffwechsel absterbender Körperzellen mit großer Atmung und aerober Glykolyse — nicht vom Standpunkt der Biologie der weißen Blutzellen, sondern vom Standpunkt des Milieus aus, in dem diese Zellen leben, also atmen und spalten, so ergibt sich die Frage: Welche spezifischen Veränderungen bewirken diese entzündlichen Zellen am Ort der Entzündung?

Daß solche spezifischen Veränderungen in einem begrenzten Gebiet überhaupt auftreten, war von vornherein nicht wahrscheinlich; denn der Körper hat das „Bestreben“, in allen Bezirken die gleiche Konzentration der Stoffe zu erhalten und, wenn irgendwo eine Anhäufung oder Abnahme irgendeines Stoffes, z. B. des Zuckers oder der Milchsäure, stattfindet, mit Hilfe von Blut und Gewebsflüssigkeiten dieses gestörte Gleichgewicht wiederherzustellen. Andererseits kann man aus den einfachen klinischen Symptomen des calor, rubor oder tumor schließen, daß es sich gerade bei der Entzündung um solche Gleichgewichtsstörungen handelt.

Kempner und *Peschel*⁶ haben versucht, ob sich solche Veränderungen in der Stoffzusammensetzung des entzündeten Gebietes gegenüber dem normalen quantitativ nachweisen ließen, und zwar Veränderungen derjenigen Stoffe, von denen feststeht, daß sie für Stoffwechsel und Funktion der Zelle notwendig sind, und die in Blut und Gewebssäften des Körpers durch das Zusammenwirken der verschiedensten Regulationssysteme auf einem konstanten, nur innerhalb sehr geringer Grenzen schwankenden Niveau erhalten werden. Solche für die Zellreaktionen notwendigen Stoffe, die im Körper in konstanten Mengenverhältnissen vorkommen, sind z. B. Sauerstoff, Kohlensäure, Zucker und Bicarbonat. *Kempner* und *Peschel* haben die Zusammensetzung dieser Stoffe im entzündeten Gebiet untersucht und zwar am Modell der entzündlichen, durch ein Cantharidenpflaster hervorgerufenen Hautblase am Menschen; bei Gesunden und bei Patienten mit verschiedenen Krankheiten, nach verschieden langer Einwirkung des gleichen entzündlichen Reizes. Es ergab sich, daß tatsächlich im entzündeten Gebiet die Stoffzusammensetzung eine vollkommen andere ist, als im gesunden Gewebe, und daß diese Stoffzusammensetzung im entzündeten Gebiet bestimmt wird durch den Stoffwechsel der entzündlichen Zellen.

Die Leukocyten haben einen Atmungs- und Spaltungsstoffwechsel. Sie veratmen Fett, Eiweiß und Zucker und sie spalten Zucker in Milchsäure. Die Milchsäure reagiert mit dem vorhandenen Natriumbicarbonat unter Austreibung von Kohlensäure.

Untersucht man den Sauerstoffgehalt der Entzündungsflüssigkeit bei verschiedenen Stadien der Entzündung, so findet sich nach 20 Stunden ein Sauerstoffgehalt von 70 mm Hg, nach 40 Stunden von 40 mm Hg, nach 60 Stunden von 21 mm Hg gegenüber einem Sauerstoffgehalt von 117 mm Hg in nichtentzündlichen Körperflüssigkeiten. Mit zunehmender Entzündungsdauer wird also der Entzündungsraum sauerstoffärmer: Entzündungsanaerobiose. Untersucht man den Zuckergehalt der Entzündungsflüssigkeit nach verschieden langer Dauer der Entzündung, so findet sich nach 20 Stunden ein durchschnittlicher Zuckergehalt von 50 mg%, nach 40 Stunden von 20 mg%, nach 80 Stunden von 7—12 mg% gegenüber einem Zuckergehalt von 80—100 mg% in den nichtentzündlichen Gewebsflüssigkeiten. Als Folge der Oxydation und Spaltung des

Zuckers findet sich also eine fortschreitende Abnahme des Zuckergehalts im Entzündungsgebiet. Entsprechend der Zuckerabnahme durch Zuckerspaltung steigt der Milchsäuregehalt nach 20 Stunden auf 35 mg %, nach 40 Stunden auf 60 mg %, nach 80 Stunden auf 100 mg %. Entsprechend der Milchsäurezunahme findet sich eine Bicarbonatabnahme mit Durchschnittswerten von 400—300 cmm im Kubikzentimeter, und entsprechend der Bicarbonatabnahme und Kohlensäurezunahme (Atmungs- und Spaltungskohlensäure) eine Zunahme der Wasserstoffionenkonzentration, die Reaktion im Entzündungsgebiet wird saurer: Entzündungssäure.

Die gefundenen Maximal- und Minimalwerte sind in Tabelle 4 zusammengestellt.

Die Konzentration an Sauerstoff, Kohlensäure, Zucker, Milchsäure und Bicarbonat im Entzündungsbereich ist also wesentlich verschieden von der Konzentration

dieser Stoffe in normalen Gewebssäften. Diese quantitativen Befunde sind der physikalisch-chemische Ausdruck der Tatsache, die man aus der klinischen Beobachtung und der pathologischen Anatomie weiß,

Tabelle 4. Maximale Veränderungen in der Entzündungsflüssigkeit.

| | Serum | Entzündungsflüssigkeit |
|------------------------|--------------------------|---------------------------|
| Sauerstoffdruck . . . | 117 mm Hg | 6 mm Hg |
| Zuckergehalt | 100 mg-% | 6 mg-% |
| Milchsäuregehalt . . . | 10 mg-% | 125 mg-% |
| Bicarbonatgehalt . . . | $25 \cdot 10^{-3}$ molar | $8,9 \cdot 10^{-3}$ molar |
| pH | 7,48 | 6,29 |

daß die Entzündung gleichsam das Entzündungsgebiet vom normalen Gewebe abschließt, sei es durch einen verlangsamten oder aufgehobenen Strom der Säfte zwischen beiden Körpergebieten, sei es durch den sog. Leukocytenwall, die „Barrikade“ der entzündlichen Zellen. Daß ein solcher funktioneller Abschluß des Entzündungsgebiets vom normalen Gewebe tatsächlich zustande kommt, muß nicht nur geschlossen werden aus der völlig veränderten Konzentration der Stoffe im Entzündungsbereich, sondern läßt sich auch unmittelbar experimentell beweisen: Erhöht man beispielsweise die Zuckerkonzentration im Blut durch perorale Zuckerezufuhr und bestimmt den Zuckergehalt beispielsweise in 3 Paaren von Entzündungsblasen, die 20, 60 und 90 Stunden bestehen, indem man unmittelbar *vor* der Zuckerbelastung je eine Entzündungsblase von den 3 Paaren, die andere *nach* der Belastung untersucht, so zeigt sich: Der Zuckergehalt in Blasen von kürzerer Entzündungsdauer steigt bei der Belastung an, nach 90stündiger Entzündungsdauer ist ein solcher Anstieg in der Entzündungsflüssigkeit nicht mehr nachzuweisen. Auch bei erhöhter Zuckerkonzentration des Blutes und des Gewebes tritt kein Zucker mehr in das Entzündungsgebiet über, der Austausch zwischen Entzündungsbereich und normalem Gewebe ist aufgehoben.

Ein derartiger grob nachweisbarer Abschluß des entzündeten Gebietes vom normalen Gewebe wie bei der durch Cantharidin erzeugten

entzündlichen Hautblase oder gar bei einer Abszedierung ist aber keineswegs notwendig für das Zustandekommen der „Reaktionen der Entzündung“. Denn wie bereits gezeigt wurde, sind diese Reaktionen nur eine Folge der Tätigkeit der entzündlichen Zellen und müssen deshalb überall dort stattfinden, wo die entzündlichen Zellen vermehrt auftreten, ohne daß gleichzeitig der Zustrom und Abfluß der Säfte beschleunigt ist. Qualitativ bewirkt jeder einzelne Leukocyt die Reaktionen der Entzündung. Die Stärke bzw. die Geschwindigkeit wird bestimmt durch die Menge der entzündlichen Zellen und durch den Grad des Abschlusses, bei dem der Stoffwechsel dieser entzündlichen Zellen stattfindet. Der „Mechanismus“ der Entzündung ist stets der gleiche, ob es sich um eine „physiologische“ oder „pathologische“ Entzündung handelt, ob die Entzündung als Blase, Phlegmone, Absceß erscheint, oder ob sie nur mikroskopisch festzustellen ist, beispielsweise als kleinzellige Infiltration.

Bei jeder Entzündung müssen sich — in stärkerem oder geringerem Maße — die gleichen physikalisch-chemischen Befunde ergeben: Eine Anaerobiose, eine Zucker- und Bicarbonatverarmung, eine Vermehrung der Kohlensäure und Milchsäure und daraus resultierend eine Abnahme des p_H . Dieser Faktor, die Abnahme des p_H im Entzündungsgebiet, war bereits bekannt durch die Arbeiten *Schades*⁸, der als Erster das Problem der Entzündung vom physikalisch-chemischen Standpunkt aus untersuchte, und der bei allen untersuchten Entzündungsprozessen feststellen konnte, daß die Wasserstoffionenkonzentration steigt. Wie der Mechanismus dieser Säurebildung ist, und daß sie notwendigerweise überall da zu finden sein muß, wo die entzündlichen Zellen wirksam sind, folgt aus dem spezifischen Stoffwechsel der Leukocyten; doch ist, wie oben gezeigt wurde, die Säurebildung nur ein Endglied in einer Kette von Reaktionen, die als die spezifischen Reaktionen der Entzündung bezeichnet wurden, und die den physikalisch-chemischen Zustand am Ort der Entzündung bestimmen.

Daß die Entzündung einen relativ abgeschlossenen Raum innerhalb des Körpers darstellt mit spezifischen physikalisch-chemischen Veränderungen des Entzündungsgebiets gegenüber dem normalen Gewebe, ist bewiesen. Andererseits ist selbstverständlich, daß trotz dieses relativen Abschlusses Beziehungen zwischen dem gesunden und entzündlich erkrankten Gewebe bestehen. Das zeigen schon die bei Entzündungen auftretenden Allgemeinerscheinungen wie Schmerz oder Fieber. Es wäre also falsch, sich den Entzündungsraum vorzustellen, als sei er hermetisch abgetrennt von den übrigen, gesunden Körperzellen, sondern man muß sich einen solchen „abgeschlossenen“ Raum innerhalb des Körpers vielleicht eher denken wie eine Wolke in der Atmosphäre, die z. B. einen ganz anderen Feuchtigkeitsgehalt und andere elektrische Ladungen enthält wie die Luftschichten um sie herum. Selbstverständlich besteht eine Wechselwirkung, sogar teilweise eine viel stärkere durch das größere

Gefälle zwischen verschiedenen Stoff- oder Gas- oder elektrischen Konzentrationen. Aber innerhalb des Entzündungsbereiches, genau so wie innerhalb der Luftschicht, in der sich eine Wolke bildet, müssen erst von dem normalen Körpergewebe vollkommen verschiedene Stoffzusammensetzungen entstanden sein, bevor sozusagen die Entladung, das Wechselspiel zwischen dem Raum der Entzündung und dem Gesamtorganismus beginnt.

So bleiben die anatomischen und chemischen Veränderungen, die am Ort der Entzündung gefunden werden, nicht nur vom Standpunkt einer isolierenden Organ- und Zellulärpathologie, sondern für die Betrachtung aller Vorgänge im Organismus, die irgendwie im Zusammenhang mit einer Entzündung stattfinden, die notwendige theoretische und experimentelle Grundlage. Für die Zellphysiologie ergibt sich aus dem Befund, daß die Entzündung die physikalische Chemie des Entzündungsgebietes grundsätzlich verändert, zunächst die Frage: Wie verhalten sich die Zellen, körpereigene und körperfremde, unter diesen Bedingungen der Entzündung, also in einem Milieu mit verändertem Sauerstoff-, Kohlen säure-, Zucker-, Bicarbonatgehalt und p_H ?

Um diese Frage zu entscheiden, war es notwendig, die lebenswichtigen Reaktionen der Zellen unter dem Einfluß der verschiedenen Faktoren der Entzündung quantitativ zu untersuchen. Es wurde deshalb die Atmung und Gärung von „normalen“ und „geschädigten“ Körperzellen, von Krebszellen und von Bakterien unter den Bedingungen der Entzündung gemessen. Wie durch die Bedingungen der Entzündung nicht nur der Stoffwechsel der Zellen, sondern auch die *Zellfunktion* verändert wird, wurde am isolierten Muskel untersucht.

III. Stoffwechsel normaler Körperzellen unter den Bedingungen der Entzündung. A. Stoffwechsel normaler Körperzellen bei vermindertem Sauerstoffgehalt des Milieus. Der Stoffwechsel normaler Körperzellen unter physiologischen Bedingungen, etwa in normalem Gewebsplasma oder in „Normal“-Ringer-Lösung gemessen, ist ein rein oxydativer Stoffwechsel, d. h. die einzige energieliefernde Reaktion normaler Körperzellen unter physiologischen Bedingungen ist die Atmung. Hemmt man die Atmung z. B. durch Sauerstoffabschluß oder vergiftet man die Zellen durch Blausäure, so bleibt den meisten tierischen Zellen und vielen Bakterien als energieliefernde Reaktion die Zuckerspaltung = Milchsäurebildung.

Doch ist bei normalen Körperzellen die Spaltung mit der Atmung verglichen gering und reicht zur Beschaffung der für das Zelleben notwendigen Calorien nicht aus (Tabelle 5).

Hält man z. B. Schnitte des gleichen Nierengewebes 1 Stunde lang unter aeroben und anaeroben Bedingungen in körperwarmer Ringer-Lösung, bringt beide Gewebe wieder in frische Ringer-Lösung und mißt ihren Stoffwechsel nur unter aeroben Bedingungen, so zeigt sich die

Atmung des anaerob gehaltenen Gewebes ist null, während die Atmung des aerob gehaltenen Gewebes gegenüber der ersten halben Stunde kaum gesunken ist. Durch einstündige Anaerobiose wird also das Nierengewebe bereits beträchtlich geschädigt (Tabelle 6). Der Grad der Schädigung durch die Anaerobiose ist abhängig von der Dauer der Einwirkung und von der Empfindlichkeit des betroffenen Gewebes (Retina beispielsweise empfindlicher als Lebergewebe, Warmblüterorgane empfindlicher als Kaltblüterorgane). Bringt man die Zellatmung zum Verschwinden, so gehen normale Körperzellen zugrunde. Wie lange Körperzellen,

Tabelle 5. Stoffwechsel von normalem Nierengewebe unter aeroben und anaeroben Bedingungen.

| Q_{O_2} Atmung = mm verbrauchten Sauerstoffs mg Gewebe · Stunden | Aus der Atmung gewonnene Energienmenge | $Q_M^{N_2}$ Zuckerspaltung = mm anaerob gebildeter Milchsäure mg Gewebe · Stunden | Aus der Spaltung gewonnene Energienmenge |
|---|---|--|---|
| — 24,8 | $119 \cdot 10^{-3}$ cal | + 6,2 | $3,2 \cdot 10^{-3}$ cal |

deren Atmung nicht durch totale Anaerobiose zum Verschwinden gebracht, sondern durch verminderten Sauerstoffdruck gehemmt ist, lebensfähig bleiben, wäre eine lohnende Aufgabe experimentell festzustellen, auch mit Hinblick auf die Frage des zur Erhaltung des

Tabelle 6. Wirkung der Anaerobiose auf normales Nierengewebe.

| | Q_{O_2} (Sauerstoff- verbrauch) | Q_{CO_2} (Kohlensäure- abgabe) | Q_{O_2} (Sauerstoff- verbrauch) | Q_{CO_2} (Kohlensäure- abgabe) |
|--|---|--|---|--|
| Erste $\frac{1}{2}$ Stunde | — 18,7 | + 16,8 | — 19,3 | + 17,4 |
| Zweite und dritte $\frac{1}{2}$ Stunde | aerob gehalten | | anaerob gehalten | |
| Vierte $\frac{1}{2}$ Stunde | — 16,5 | + 14,9 | — 0 | + 0 |

Zellebens „absolut notwendigen“ Energieminimums verglichen mit dem Maximum der Energiegewinnungsmöglichkeit.

Wie aus Tabelle 4 ersichtlich ist, nimmt mit fortschreitender Entzündung der Sauerstoffdruck der entzündlichen Flüssigkeit ab. Auf Grund der Versuche von Warburg⁹ an Kulturen von *Micrococcus candidans*, die er bei 1° C in Kochsalz-Phosphatlösungen untersuchte, galt es als Axiom der Zellphysiologie, daß die Atmung isolierter Zellen vom Sauerstoffdruck unabhängig sei und so lange maximal bleibe, bis die gesamte vorhandene Sauerstoffmenge verbraucht sei. Kempners Versuche an roten und weißen Blutzellen^{3, 4}, Nierengewebschnitten¹⁰ und Bakterien^{3, 4, 11} haben jedoch gezeigt, daß die Warburgschen Befunde zwar für Phosphatlösungen und Temperaturen von 1—10° zutreffen,

daß aber bei Körpertemperatur und im physiologischen Milieu (Ringer-Bicarbonat oder Serum) die Zellatmung sehr beträchtlich mit Änderungen des Sauerstoffdrucks variiert, daß also schon lange vor dem Aufhören der Atmung durch komplette Anaerobiose eine Atmungs-
hemmung durch verminderten Sauerstoffdruck eintreten kann, und zwar bereits bei Drucken, die wesentlich höher liegen als die in der Entzündungsflüssigkeit gefundenen.

Unter den Bedingungen der Entzündung ist nicht nur der Sauerstoffdruck vermindert — durch den Sauerstoffmehrerverbrauch der entzündlichen Zellen und den geringen Sauerstoffzustrom aus dem gesunden Gewebe —, sondern auch die Strömungsgeschwindigkeit der sauerstoffübertragenden Flüssigkeit innerhalb des Entzündungsbereichs, so daß

Tabelle 7. Atmung von normalem Nierengewebe bei verschiedener Glucosekonzentration des Milieus.

| | mg Glucose in 100 ccm | | | | |
|--|-----------------------|--------|--------|--------|--------|
| | 10 | 20 | 40 | 80 | 200 |
| Q_{O_2} Atmung = $\frac{\text{ccm verbrauchten Sauerstoffs}}{\text{mg Gewebe} \cdot \text{Stunden}}$ | — 29,2 | — 29,6 | — 31,5 | — 26,4 | — 32,5 |

für den Teil des entzündeten Gewebes, der von dem lokalen „Kreislauf“ der entzündlichen Flüssigkeit erst relativ spät versorgt wird, eine totale Anaerobiose anzunehmen ist. Und handelt es sich dazu nicht, wie bei den zitierten Versuchen, um sterile Entzündungen, sondern beispielsweise um Entzündungen, die auf den Reiz von Krebszellen oder Bakterien hin entstehen, so wird die im Entzündungsraum vorhandene Sauerstoffmenge noch vermindert durch den Sauerstoffverbrauch der Bakterien oder Krebszellen, so daß die Abnahme des Sauerstoffdruckes bis zur vollständigen Anaerobiose eher als unter sterilen Verhältnissen beginnt. Wie in Tabelle 6 gezeigt, vermögen normale Körperzellen anaerob nur kurze Zeit ihr Leben zu erhalten. Ist die Entzündung also fortgeschritten, so geht das entzündete Gewebe zugrunde. Doch ist aus Kapitel II ersichtlich daß die vollständige Anaerobiose erst später eintritt als die Verminderung des Zucker- und Bicarbonatgehalts und die Vermehrung der Wasserstoffionenkonzentration im Milieu der Entzündung.

B. Stoffwechsel normaler Körperzellen bei vermindertem Zuckergehalt des Milieus. Mißt man den Stoffwechsel von normalem Nierengewebe unter aeroben Bedingungen in Ringerlösung bei physiologischem Bicarbonatgehalt, physiologischer Wasserstoffionenkonzentration und bei ungefähr den Zuckerkonzentrationen, wie sie in der entzündlichen Flüssigkeit nach dreitägiger Entzündungsdauer gefunden waren, so ergibt sich (Tabelle 7):

Die Zuckerkonzentration des Milieus ist bei Konzentrationen zwischen 10 und 200 mg in 100 ccm Flüssigkeit ohne Einfluß auf die Atmung des Nierengewebes. In einer *Ringer*-Lösung mit dem Zuckergehalt 0 war die durch mehrere Stunden gemessene Atmung des Nierengewebes um ungefähr 30—50% geringer als bei einem Zuckergehalt von 0,2%. Der respiratorische Quotient betrug für das in zuckerfreier *Ringer*-Lösung befindliche Nierengewebe 0,6—0,7, für das in zuckerhaltiger *Ringer*-Lösung befindliche Nierengewebe 0,83—0,89. Der Zucker der umspülenden Flüssigkeit ist also durch andere, in der Nierenzelle gespeicherte Stoffe

Tabelle 8. Atmung von normalem Nierengewebe in Ringerlösung ohne Glucosezusatz.

| | Sauerstoffverbrauch und Kohlensäureabgabe | | | | | | Würde lediglich Zucker veratmet, so ergäbe sich als Zucker- verbrauch durch 1 mg Nierengewebe in 2 Stdn. | Tatsächlich vorhanden sind in 1 mg Nierengewebe (Zuckerbestimmung nach Hagedorn-Jensen) |
|----------------|---|------------------|----------------------|---------------------------------------|------------------|----------------------|---|---|
| | in <i>Ringer</i> -Lösung mit Glucose | | | in <i>Ringer</i> -Lösung ohne Glucose | | | | |
| | QO ₂ | QCO ₂ | $\frac{QCO_2}{QO_2}$ | QO ₂ | QCO ₂ | $\frac{QCO_2}{QO_2}$ | | |
| Erste 60 Min. | — 18,5 | + 16,5 | 0,89 | — 13,3 | + 8,5 | 0,64 | 0,032 mg Zucker | 0,003 mg Zucker |
| Zweite 60 Min. | — 22,4 | + 18,6 | 0,83 | — 10,4 | + 7,6 | 0,73 | | |

weitgehend ersetzbar. Denn die in der Zelle vorhandene Zuckermenge ist zu gering, um ohne Zustrom von Zucker aus dem umgebenden Milieu längere Zeit den Stoffwechsel zu erhalten.

In Tabelle 8 beträgt z. B. die Atmung von 1 mg Nierengewebe in 2 Stunden 23,7 cmm Sauerstoff. Da von 1 Molekül Zucker zur vollständigen Oxydation 6 Moleküle Sauerstoff verbraucht werden, so werden $\frac{23,7 \cdot 180}{6 \cdot 22400} = 0,032$ mg Zucker von 1 mg Nierengewebe innerhalb 2 Stunden veratmet. Gleichzeitig mit dem Beginn der Messung wurden einige Gewebsschnitte bei 100 Grad Celsius getrocknet, gewogen und der Zuckergehalt nach *Hagedorn-Jensen* bestimmt. Die in 1 mg Nierengewebe enthaltene Zuckermenge war, entsprechend dem Zuckergehalt des Blutes (Trockengewicht = ungefähr $\frac{1}{5}$ Frischgewicht), 0,003 mg. Die als reduzierende Substanz im Gewebe nachweisbare Zuckermenge wäre also nur $\frac{1}{10}$ der als Zuckerverbrauch berechneten Atmung.

C. Stoffwechsel normaler Körperzellen bei vermindertem *Bicarbonat*-gehalt des Milieus. Mißt man den Stoffwechsel von normalem Nierengewebe unter aeroben Bedingungen bei physiologischem Zuckergehalt und p_H und bei ungefähr den Bicarbonatkonzentrationen, wie sie in der entzündlichen Flüssigkeit nach 1—3 tägiger Entzündungsdauer gefunden waren (wobei man das p_H durch entsprechende Verminderung des Kohlendruckes konstant erhält), so ergibt sich (Tabelle 9):

Die Atmung von normalem Nierengewebe ist unabhängig vom Bicarbonatgehalt des Milieus. Der verminderte Bicarbonatgehalt der entzündlichen Flüssigkeit ist also ohne Einfluß auf den Stoffwechsel normaler Körperzellen.

D. Stoffwechsel normaler Körperzellen bei vermehrter *Wasserstoffionen-konzentration* des Milieus. Mißt man den Stoffwechsel von normalem Nierengewebe bei konstantem Zucker- und Bicarbonatgehalt und verändert die Wasserstoffionen-konzentration, indem man den Kohlensäuredruck des Milieus entsprechend den in der entzündlichen Flüssigkeit gefundenen Zahlen verändert, so ergibt sich (Tabelle 10):

Tabelle 9. Atmung von normalem Nierengewebe bei verschiedener Bicarbonatkonzentration des Milieus.

| | Bicarbonatkonzentration | | |
|---------------------|---------------------------|--------------------------|--------------------------|
| | $8,9 \cdot 10^{-3}$ molar | $16 \cdot 10^{-3}$ molar | $25 \cdot 10^{-3}$ molar |
| Q_{O_2} Atmung | — 26,3 | — 23,9 | — 25,7 |

Die Atmung von normalem Nierengewebe ist unabhängig von der Wasserstoffionenkonzentration des Milieus innerhalb des untersuchten Bereiches von $p_H = 7,8$ bis $p_H = 6,4$.

Der Stoffwechsel normaler Körperzellen unter den Bedingungen der Entzündung: Verminderung des Zucker-, Bicarbonatgehalts und p_H

Tabelle 10. Atmung von normalem Nierengewebe bei verschiedener Wasserstoffionenkonzentration des Milieus.

| | p_H | | | | |
|--|--------|--------|--------|--------|--------|
| | 7,47 | 7,28 | 6,84 | 6,77 | 6,45 |
| Q_{O_2} Atmung = $\frac{\text{cmm verbrauchten Sauerstoffs}}{\text{mg Gewebe} \cdot \text{Stunden}}$ | — 22,4 | — 26,2 | — 25,8 | — 26,7 | — 23,4 |

unterscheidet sich also kaum von dem Stoffwechsel normaler Körperzellen unter physiologischen Bedingungen. Nur wenn es im späteren Stadium einer Entzündung bei Sauerstoffabschluß des Entzündungsraums zu einem beträchtlichen Absinken des Sauerstoffdrucks kommt, ist der Stoffwechsel normaler Körperzellen wesentlich verändert. Die Zellatmung nimmt mit sinkendem Sauerstoffdruck ab. Kommt es zu einer vollkommenen Anaerobiose, so tritt an Stelle der Atmung als energieliefernde Reaktion die Zuckerspaltung, doch reicht die Spaltungsenergie nicht aus, das Leben der Zelle zu erhalten, und das entzündete Gewebe geht zugrunde.

IV. Stoffwechsel geschädigter Körperzellen unter den Bedingungen der Entzündung. Der Stoffwechsel normaler Körperzellen unter physiologischen Bedingungen ist ein reiner Atmungsstoffwechsel, d. h. die Atmung

normaler Körperzellen ist im Verhältnis zu ihrer Zuckerspaltung = Milchsäurebildung so groß, daß die gebildete Milchsäure wieder oxydiert wird und kein Milchsäurerest erscheint.

Werden Körperzellen innerhalb oder außerhalb des Körpers geschädigt und gehen zugrunde, so werden Atmung und Spaltung nicht im gleichen Maße betroffen: die Zellschädigung beginnt mit einer Schädigung der Atmung, das Aufhören der Spaltung bedeutet den endgültigen Tod. In dieser Arbeit werden als „geschädigte“ Körperzellen ausschließlich Zellen im Beginn einer Zellschädigung bezeichnet, d. h. Zellen mit einer geschädigten Atmung, deren Stoffwechsel also kein reiner Atmungsstoffwechsel ist, sondern ein Stoffwechsel mit Atmung und Spaltung.

Diesen Schädigungsstoffwechsel kann man experimentell außerhalb des Körpers herbeiführen z. B. durch Abkühlung der Zellen oder bei empfindlichen Zellen, indem man als Milieu anstelle von Blut oder Gewebsserum eine eiweißfreie Salzlösung, z. B. *Ringer*-Lösung verwendet. Statt des bei ungeschädigten Körperzellen rein oxydativen Stoffwechsels tritt eine aerobe Glykolyse parallel mit der Zellschädigung auf.

Innerhalb des Körpers, also bereits unter physiologischen Bedingungen, sind es lediglich die reifen Blutzellen, die Leukocyten und die Erythrocyten, die diesen Schädigungsstoffwechsel mit Atmung und aerober Glykolyse besitzen. Die reifen Blutzellen sind also, wie schon im Kapitel I gezeigt wurde, nach ihrem Stoffwechseltyp als Zellen zu bezeichnen, die schon innerhalb des Körpers zugrunde gehen.

Ich habe sowohl an Zellen, die außerhalb des Körpers geschädigt wurden, wie an den reifen Blutzellen die Wirkungen der Entzündung untersucht, also die Abhängigkeit der Atmung und aeroben Spaltung tierischer Zellen von Veränderungen der Zucker-, Bicarbonat- und Wasserstoffionenkonzentration. Daß die fermentativen Spaltungsreaktionen von Veränderungen des Milieus weitgehend abhängig sind und daß beinahe zu jeder Fermentwirkung ein eigenes optimales Milieu gehört, weiß man besonders durch die Abhängigkeit der Fermentleistungen von der Wasserstoffionenkonzentration. Bei tierischen Zellen wurde ein Einfluß der Wasserstoffionenkonzentration durch *Rona* und *Wilenko*¹² nachgewiesen für die anaerobe Glykolyse roter Blutzellen, durch *Meyerhof*¹³ für die anaerobe Glykolyse des Muskels und durch *Warburg*² der Einfluß der Zucker-, Bicarbonat- und Wasserstoffionenkonzentration für die anaerobe Glykolyse der Tumoren.

Da erst im letzten Stadium einer Entzündung ein vollkommener Sauerstoffabschluß, eine Anaerobiose zustandekommt, andererseits sofort mit dem Beginn des Stoffwechsels der entzündlichen Zellen Veränderungen der Zucker-, Bicarbonat- und Wasserstoffionenkonzentration eintreten, so ist für die Frage nach dem Verhalten der menschlichen und tierischen Körperzellen im entzündlichen Milieu besonders wichtig die Abhängigkeit der aeroben Spaltung und der *Atmung* von den genannten Faktoren.

Mißt man den Stoffwechsel von Mäuseperitoneum, das durch ungefähr 15 Min. langen Aufenthalt in kalter *Ringer*-Lösung geschädigt wurde, unter aeroben Bedingungen z. B. bei physiologischem Zuckergehalt und p_H und bei ungefähr den Bicarbonatkonzentrationen, wie sie in der entzündlichen Flüssigkeit nach 1–3tägiger Entzündungszeit gefunden waren (wobei man die Wasserstoffionenkonzentration durch entsprechende Verminderung des Kohlensäuredrucks konstant erhält), so ergibt sich (Abb. 1):

Die Atmung des geschädigten Peritoneums ist bei vermindertem Bicarbonatgehalt des Milieus konstant, die Spaltung beträchtlich abgesunken.

Den Einfluß der bei der Entzündung gefundenen Bicarbonatkonzentrationen auf den Stoffwechsel reifer Blutzellen veranschaulichen Abb. 2 und Abb. 3. Wieder ist die Atmung, sowohl der Erythrocyten wie der Exsudatleukocyten, bei Verminderung des Bicarbonatgehalts der um spülenden Flüssigkeit kaum herabgesetzt, während die aerobe Spaltung beträchtlich absinkt.

Zur Gewinnung der Erythrocyten wurde das Blut aus der Armvene in körperwarmer, citrathaltiger *Ringer*-Lösung steril aufgefangen, Plasma und Leukocyten kurz abzentrifugiert und die Erythrocyten in sauerstoffgesättigten *Ringer*-Lösungen mit verschiedenem Bicarbonatgehalt suspendiert. Das p_H wurde in den verschiedenen *Ringer*-Lösungen

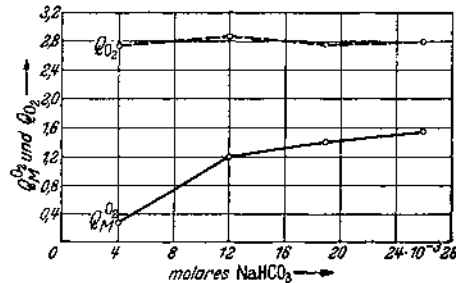


Abb. 1. Stoffwechsel von geschädigtem Mäuseperitoneum bei verschiedener Bicarbonatkonzentration des Milieus.

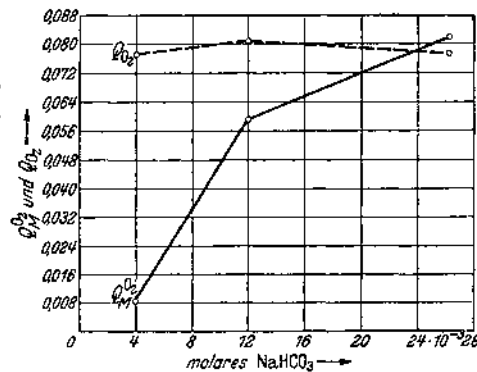


Abb. 2. Stoffwechsel von Menschenerythrocyten bei verschiedener Bicarbonatkonzentration des Milieus.

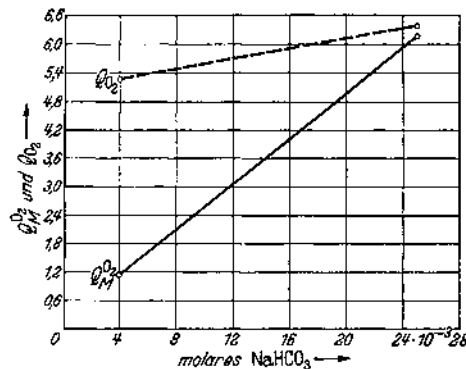


Abb. 3. Stoffwechsel von Menschen-Exsudatleukocyten bei verschiedener Bicarbonatkonzentration des Milieus.

übereinstimmend gehalten durch Sättigung mit verschiedenen Kohlensäurekonzentrationen.

Zur Gewinnung der Exsudatleukocyten wurden 20–30 Stunden alte Cantharidenblasen punktiert, das Punktat sofort im Thermostaten mit einem Sauerstoff-Kohlensäuregemisch von 2–3% CO_2 , dem wahrscheinlichen Bicarbonatgehalt entsprechend, gesättigt und soviel Zucker zugegeben, daß die Zuckerkonzentration etwa 100–120 mg% betrug. Während der Sättigungszeit wurde der genaue Bicarbonatgehalt bestimmt, einem Teil der Versuchsflüssigkeit soviel Bicarbonat zugegeben, daß die physiologische Konzentration von $25 \cdot 10^{-3}$ erreicht war, und mit 5,4% CO_2 gesättigt. Ein anderer Teil der Versuchsflüssigkeit wurde bei seiner ursprünglichen Bicarbonatkonzentration und bei dem entsprechenden

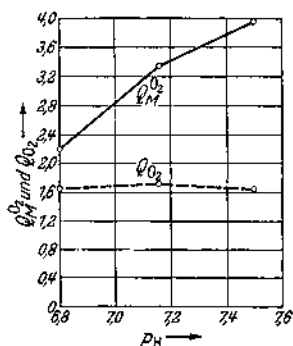


Abb. 4. Stoffwechsel des Blutes bei myeloider Leukämie bei verschiedener Wasserstoffionenkonzentration.

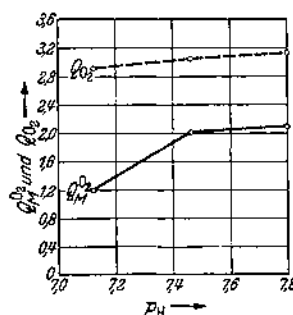


Abb. 5. Stoffwechsel von geschädigten Mäuseperitoneum bei verschiedener Wasserstoffionenkonzentration des Milieus.

Kohlensäuredruck gemessen. Um den Einfluß noch geringerer Bicarbonatkonzentrationen als den nach 20–30stündiger Entzündungsdauer vorhandenen, auf den Stoffwechsel der Exsudatleukocyten untersuchen zu können, wurde ein dritter Teil des zellhaltigen Punktats mit einer durch Zentrifugieren zellfrei gemachten Exsudatflüssigkeit des gleichen Patienten verdünnt, deren Bicarbonat durch Zusatz der entsprechenden Menge von $\frac{1}{10}$ Salzsäure vor Beginn des Versuches entfernt war. Auch der zur Bicarbonatverdünnung benutzten zellfreien Exsudatflüssigkeit wurde soviel Zucker zugegeben, daß 100 ccm Exsudat ungefähr 120 mg Zucker enthielten.

Genau dasselbe Verhalten des Stoffwechsels läßt sich auch für die anderen physikalisch-chemischen Faktoren der Entzündung, die Veränderung der Wasserstoffionen- und Zuckerkonzentration, nachweisen (Abb. 4–7).

Die verschiedenen Wasserstoffionenkonzentrationen wurden, sowohl in Ringer-Lösung wie im entzündlichen Exsudat, hergestellt durch Veränderungen des Kohlensäuredrucks bei konstantem Bicarbonatgehalt

des Milieus, die Veränderungen der Zuckerkonzentration durch entsprechende Zusammensetzung der Ringer-Lösung oder — in der Exsudatflüssigkeit — durch Zugabe von Zucker oder Verdünnung mit einem Exsudat, dessen Zucker durch genügend lange Einwirkung des Stoffwechsels der entzündlichen Zellen bei konstant gehaltenem Bicarbonatgehalt und p_H verbraucht war.

Bei allen unter diesen Bedingungen untersuchten Zellen mit dem Typus des Schädigungsstoffwechsels fand sich die gleiche Gesetzmäßigkeit: daß die Atmung der geschädigten Körperzellen mit Atmungs- und Spaltungsstoffwechsel — ebenso wie die Atmung normaler Körperzellen mit reinem Atmungsstoffwechsel — innerhalb der Veränderungen des

Zucker-, Bicarbonatgehalts und p_H , wie sie im Entzündungsmilieu auftreten, konstant bleibt, während die Spaltung des Zuckers zu Milchsäure sich als außerordentlich abhängig von diesen Faktoren erwies. Wirken alle Faktoren gemeinsam, wie im Bereiche einer Entzündung, so verschwindet die Glykolyse fast vollständig, und die geschädigten Körperzellen verhalten sich in ihrem Stoffwechsel scheinbar wie normale Körperzellen.

Für den Ablauf der Entzündung selbst ist diese Abhängigkeit der Glykolyse entscheidend dadurch, daß die Bewirker der entzündlichen Reaktionen, die Exsudatleukocyten, selber solche geschädigten Zellen sind, deren Stoffwechsel weitgehend dem Einfluß der geschilderten Milieuveränderungen unterworfen ist. So erzeugen die entzündlichen Zellen durch ihren Stoffwechsel im Entzündungsraum geradezu die Verhältnisse, die den für die Entzündung wesentlichsten Teil ihres Stoffwechsels, die Spaltung, verhindern, und die Entzündung kann, wenn die Bedingungen der Zucker- und Bicarbonatverarmung und der Vermehrung der Wasserstoffionenkonzentration erfüllt sind, nur noch in das letzte Stadium übergehen, die vollständige Anaerobiose, bei der nicht nur den Leukocyten die letzte

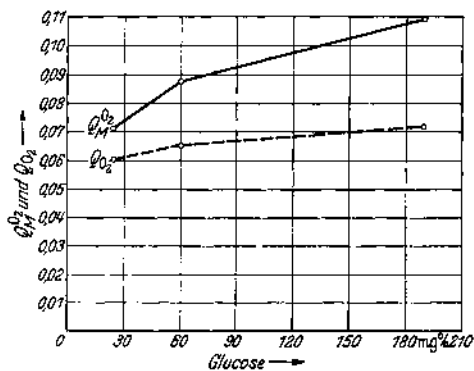


Abb. 6. Stoffwechsel von Menschenerythrocyten bei verschiedener Glucosekonzentration des Milieus.

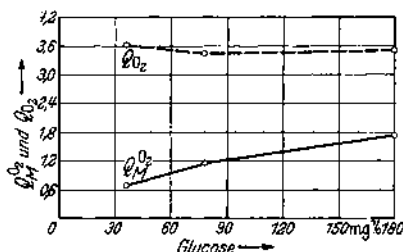


Abb. 7. Stoffwechsel von geschädigtem Mäuseperitoneum bei verschiedener Glucosekonzentration des Milieus.

Möglichkeit, Energie zu gewinnen, genommen ist, sondern allen innerhalb des Entzündungsraumes befindlichen Körperzellen.

V. *Muskelfunktion unter den Bedingungen der Entzündung.* Es konnte als Gesetzmäßigkeit für den Zellstoffwechsel festgestellt werden, daß unter den Bedingungen des Zucker- und Bicarbonatmangels und des sauren p_H die Atmung konstant bleibt, während die aerobe Glykolyse in höchstem Maße davon abhängig ist. Diese Abhängigkeit der Glykolyse wurde nachgewiesen bei Zellen, die entweder innerhalb des Körpers geschädigt sind oder außerhalb des Körpers, infolge einer experimentell gesetzten Schädigung, absterben, während bei normalen Körperzellen

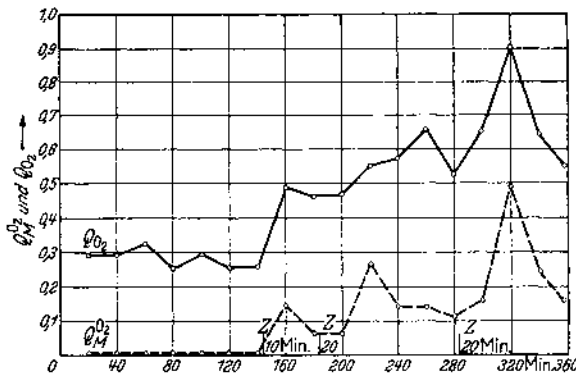


Abb. 8. Atmung und aerobe Glykolyse von Froschmuskel in Ruhe und bei Tätigkeit.

unter physiologischen Bedingungen eine aerobe Glykolyse nicht erscheint.

Daß durch beide Reaktionen, durch Atmung ebenso wie durch Gärung, calorienmäßig gleichwertige Energie gewonnen werden kann, ist selbstverständlich. Ebenso ist aber bewiesen, daß gewisse Leistungen der Zelle an einen bestimmten Weg

der Energiegewinnung gebunden sind, z. B. die Muskelarbeit an die Glykolyse. Denn wie *Fletcher und Hopkins*¹⁴ gefunden haben, tritt bei der Muskelarbeit eine vermehrte Milchsäurebildung auf; wie *Meyerhof*¹³ zeigen konnte, besteht eine quantitative Übereinstimmung zwischen der für die Leistung des Muskels benötigten und der bei der Spaltung des Zuckers zu Milchsäure freiwerdenden Energie. Die Funktion des Muskels, seine Fähigkeit sich zusammenzuziehen und zu arbeiten, ist also verbunden mit seiner Fähigkeit zu glykolysieren, gleichgültig ob neben der Glykolyse auch andere chemische Reaktionen wie beispielsweise die Phosphagenspaltung eine wesentliche Bedeutung für die Muskelkontraktion besitzen.

Der Stoffwechsel des ruhenden Muskels ist wie der Stoffwechsel aller normalen ungeschädigten Körperzellen ein rein oxydativer. In Abb. 8 sind als Kurve dargestellt die manometrischen Messungen des ruhenden und tätigen Muskels mit einer für die Messung des Muskelstoffwechsels geeigneten Modifikation der *Warburgschen* sog. Zwei-Kästchen-Methode.

Beide Kästchen enthalten ein Paar eingeschmolzener Platinelektroden, auf denen beispielsweise der rechte und linke Sartorius desselben Frosches befestigt sind. Der Muskel ruht in einer zuckerhaltigen *Ringer*-Lösung

mit einem Bicarbonatgehalt von $25 \cdot 10^{-3}$ molar, der Gasraum ist mit 5% CO_2/O_2 gesättigt. Die Elektroden werden so miteinander verbunden, daß die beiden Muskeln in beiden Gefäßen vom gleichen elektrischen Reiz getroffen werden. Die abgelesenen Druckunterschiede in Millimeter *Brodiescher* Flüssigkeit, multipliziert mit den Gefäßkonstanten für die Zwei-Kästchen-Methode, ergeben die Menge des verbrauchten Sauerstoffs und der gebildeten Kohlensäure, die einerseits Atmungskohlensäure ist, andererseits aus dem Bicarbonat durch Milchsäurebildung entsteht. Rechnet man mit einem maximalen respiratorischen Quotienten von 1, so ist die Kohlensäuremenge, die die Menge des verbrauchten Sauerstoffs übersteigt, durch Säurebildung aus dem Bicarbonat entstanden und gibt das Maß an für die Größe der aeroben Glykolyse: Kubikmillimeter gebildeter Milchsäure = Kubikmillimeter Gesamtkohlensäure minus der dem Sauerstoffverbrauch gleichgesetzten Atmungskohlensäure.

Im Ruhestoffwechsel des Muskels ist keine Milchsäurebildung nachzuweisen; das Verhältnis gebildete Kohlensäure : Sauerstoff ist kleiner als 1. Läßt man den Muskel maximal arbeiten, so erscheint eine große Milchsäurebildung, obwohl sich der Muskel in reiner Sauerstoffatmosphäre befindet. Ob auch an der Oberfläche jeder einzelnen Muskelzelle der optimale Sauerstoffdruck bleibt oder die Sauerstoffdiffusion bei maximaler Arbeit nicht mehr ausreicht und deshalb der Sauerstoffdruck innerhalb des Muskels sinkt, ist mangels direkter Methoden nicht mit Sicherheit festzustellen. Zugleich mit dem Erscheinen von Milchsäure beim maximal arbeitenden Muskel ist eine Steigerung der Atmung zu beobachten (Abb. 8). Diese Steigerung der Atmung ist, wie *Meyerhoff*¹³ gefunden hat, bedingt durch das bei der Spaltung gebildete Lactat, nicht etwa durch die gebildete Säure. Denn auch neutrales Lactatsalz, einer zuckerhaltigen *Ringer*-Lösung zugesetzt, bewirkt eine Steigerung der Muskelatmung. Mehr oder minder lange Zeit nach Aufhören der Arbeit verschwindet die Glykolyse, der Muskel kehrt zu seinem rein oxydativen Ruhestoffwechsel wieder zurück. Beim mäßig arbeitenden Muskel steigt die Atmung, eine Säurebildung ist nicht nachzuweisen. Bei starker Arbeit ist die Steigerung der Spaltung größer, als die entsprechende Steigerung der Atmung. Die Milchsäure verbindet sich mit dem vorhandenen Bicarbonat zu Natriumlactat unter Austreibung von Kohlensäure. Der Kohlensäuregehalt steigt also, während die Bicarbonatkonzentration sinkt, das Muskelzellmilieu wird saurer. Zwar wird durch die bei der Muskelarbeit auftretende vermehrte Blutzirkulation diese Milieuveränderung zu einem gewissen Teil wieder ausgeglichen, doch zeigt schon die Tatsache, daß jeder Muskel bei überdosierter Arbeit ermüdet, und für eine Zeit lang funktionsuntüchtig wird, von vornherein, daß auch zwischen dem Muskelmilieu und der Stoffzusammensetzung im übrigen Organismus ein vollkommenes physikalisches und chemisches Gleichgewicht nicht besteht.

Diese Veränderung des Bicarbonatgehalts und der Wasserstoffionenkonzentration im Muskelmilieu bei einer stärkeren Muskelarbeit reguliert die Größe der Muskelarbeit überhaupt. Denn wie bereits oben beschrieben, konnte bei allen untersuchten Geweben festgestellt werden,

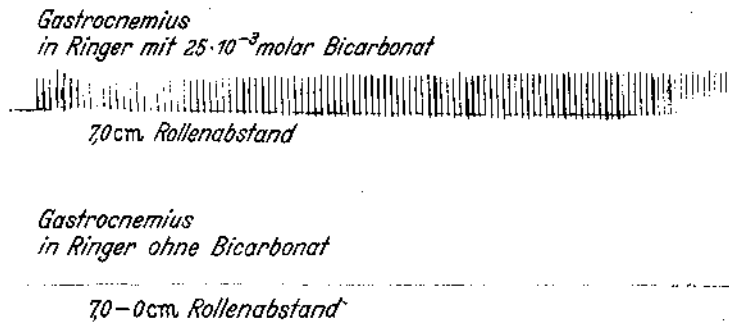


Abb. 9. Frostmuskelzuckungen mit und ohne Bicarbonatgehalt der Ringer-Lösung.

daß die Größe der Glykolyse auch innerhalb der z. B. bei einer Entzündung vorkommenden Schwankungen abhängig ist von der Zucker-, Bicarbonat- und Wasserstoffionenkonzentration, während die Atmung innerhalb

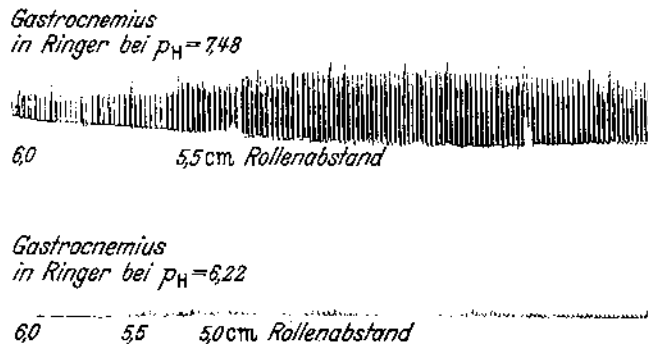


Abb. 10. Frostmuskelzuckungen bei verschiedenem p_H .

dieses Bereichs sich völlig unabhängig von diesen Faktoren zeigte. Wird also bei einer maximalen Arbeit mehr Säure gebildet als fortgeschafft werden kann, so wird sowohl durch den verminderten Bicarbonatgehalt wie die vermehrte Wasserstoffionenkonzentration die Spaltungsfähigkeit des Muskels herabgesetzt. Die Leistung des Muskels ist aber verbunden mit seiner Fähigkeit zu spalten. Also werden durch eine starke bzw. überstarke

Arbeit des Muskels die Bedingungen erzeugt, die eine weitere Tätigkeit dieses Muskels verhindern; die Muskelfunktion wird gleichsam durch einen Sperrmechanismus des eigenen Stoffwechsels reguliert. Da die Atmung im Gegensatz zur Glykolyse durch die genannten Milieuveränderungen der Bicarbonat- und Wasserstoffionenkonzentration nicht beeinflusst wird, ist sie imstande, in dieser Ermüdungsphase des Muskels die angehäuften Milchsäure zu oxydieren: das Bicarbonat wird vermehrt, die Wasserstoffionenkonzentration vermindert, die für die Glykolyse günstigen Bedingungen sind wieder hergestellt, der Muskel vermag sich zu kontrahieren und das Wechselspiel zwischen Leistung und Ermüdung beginnt von neuem.

Abb. 9 zeigt Zuckungskurven von entsprechenden Muskeln desselben Frosches in einem Milieu mit normaler Bicarbonatkonzentration und in einem bicarbonatfreien Milieu, Abb. 10 Zuckungskurven von entsprechenden Muskeln desselben

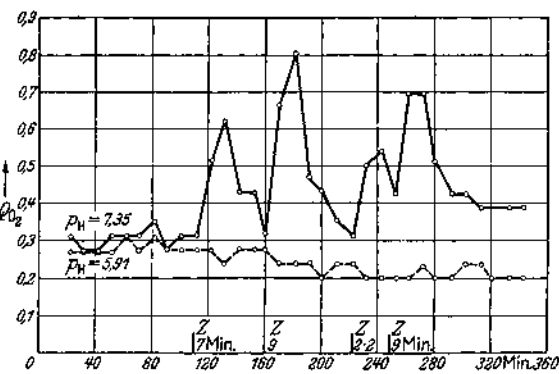


Abb. 11. Atmung von Froschmuskeln in Ruhe und bei Tätigkeit bei verschiedenem p_H .

Frosches bei einem physiologischen p_H von 7,48 und bei einem p_H von 6,22, also einer Wasserstoffionenkonzentration, wie sie bei Entzündungen vorkommt.

Zuckt als Folge einer solchen gesteigerten Wasserstoffionenkonzentration des Muskelmilieus der Muskel nicht mehr, so wird auch keine Milchsäure gebildet und die Steigerung der Atmung, die auf Zuckung und Milchsäurebildung folgt, muß ausbleiben. Abb. 11 zeigt die Atmung zweier entsprechender Muskeln des gleichen Frosches, die in *Ringer-Phosphatlösung* von verschiedenem p_H suspendiert sind. Die Atmung der ruhenden Muskeln stimmt überein, ist also unabhängig von dem hier gesetzten Unterschied des p_H ; werden aber beide Muskeln gleichzeitig durch den gleichen elektrischen Strom gereizt, so zeigt der bei physiologischem p_H befindliche Muskel große Atmungssteigerungen als Folge der abgelaufenen Zuckungen und der vermehrten Milchsäurebildung, während der bei saurem p_H befindliche Muskel keine Veränderung der Atmungsgröße zeigt. Die Spaltungsfähigkeit des Muskels war durch das saure p_H unterbrochen, der elektrische Strom konnte daher keine Kontraktion auslösen und die Atmung steigert sich nicht.

Wie also die Physiologie des Muskels zeigt, handelt es sich bei der Ermüdung des Muskels nach überdosierter Arbeit um die gleichen

Veränderungen des physikalisch-chemischen Milieus, wie sie infolge des Stoffwechsels der Entzündung auftreten. Was bei der Entzündung bewirkt wird durch die aerobe Glykolyse der Exsudatleukocyten, wird bei der Ermüdung des Muskels bewirkt durch die aerobe Glykolyse der überanstrengten Muskelzelle. Gemeinsam ist beiden Zuständen, der Entzündung wie der Ermüdung, daß sie es der Zelle unmöglich machen, durch Zuckerspaltung Energie zu gewinnen. Mit dieser Schädigung der glykolytischen Fähigkeit verliert der Muskel auch seine Fähigkeit zu Kontraktion und Arbeit.

Daß eine Entzündung des Muskels, gleichgültig ob es sich um quergestreifte oder glatte Muskulatur handelt, auch immer eine Funktionsuntüchtigkeit des entzündeten Muskels bewirkt, ist also selbstverständlich; ebenso daß außer Entzündung und Ermüdung auch noch andere physikalisch-chemische Ursachen bestehen können, die zu einer Leistungsunfähigkeit des Muskels führen. So kann ein glykogenverarmter Muskel nicht optimal arbeiten, da ihm nicht genügend energieliefernde Substanz als Spaltungsmaterial zur Verfügung steht, und ein Muskel, der unter krankhaften Verhältnissen nicht ausreichend mit Sauerstoff versorgt ist, wird besonders bei gesteigerter Arbeit die gebildete Säure nicht so schnell fortoxydieren können wie bei reichlicher Sauerstoffversorgung und wird deshalb leichter ermüden.

Alle diese Veränderungen der physikalisch-chemischen Stoffzusammensetzung im Muskel, gleichgültig ob Entzündung, Ermüdung, Glykogenverarmung oder ungenügende Sauerstoffversorgung, führen zu demselben Zustandsbild wie die anatomische Zerstörung der Muskelfibrillen mit Ersatz durch bindegewebige Schwielen, mit dem Unterschied, daß es sich bei einem mit Schwielen durchsetzten Muskel um eine irreversible, dauernde Schädigung der Funktionstüchtigkeit handelt, bei der Entzündung oder Ermüdung nur um eine reversible, momentane, die aufhört, sobald die physikalisch-chemische Zusammensetzung des Muskelmilieus wieder normalisiert ist.

Die Schwere des augenblicklichen Krankheitsbildes, das durch eine solche Funktionsuntüchtigkeit z. B. des Herzmuskels hervorgerufen wird, ist nicht abhängig davon, ob eine anatomisch bedingte irreversible oder physikalisch-chemisch bedingte reversible Schädigung diese Funktionsunfähigkeit verursacht, sondern der Grad der klinisch sichtbaren Krankheitserscheinungen richtet sich lediglich nach der Lokalisation dieser reversiblen oder irreversiblen Schädigung. Sind z. B. selbst zahlreiche Muskelbündel des Musculus trapezius zerstört und durch bindegewebige Schwielen ersetzt, so wird man klinisch trotzdem kaum Ausfallerscheinungen beobachten, handelt es sich hingegen um eine wenn auch reversible Schädigung des Hisschen Bündels, z. B. durch eine Entzündung, so werden grobe Funktionsstörungen evident.

VI. Krebsstoffwechsel unter den Bedingungen der Entzündung. Es wurde in Kapitel II gezeigt, wie durch den Stoffwechsel der entzündlichen Zellen und durch den Abschluß des Entzündungsgebiets vom umgebenden normalen Gewebe im Gebiet der Entzündung physikalisch-chemische Bedingungen geschaffen werden, die grundsätzlich von der sonst im übrigen Körper mit großer Konstanz stabilisierten Stoffzusammensetzung abweichen. In Kapitel III und IV wurde nachgewiesen, daß und in welchem Grade unter diesen abweichenden physikalisch-chemischen Bedingungen der Entzündung der Stoffwechsel der ungeschädigten und geschädigten Körperzellen sich in typischer Weise verändert und daß wiederum der normale Stoffwechsel bzw. der Stoffwechsel unter den Bedingungen der Entzündung Funktionstüchtigkeit oder -untüchtigkeit der Organe, wie am Muskel gezeigt wurde, bestimmt.

Die Entzündung ist aber nicht nur ein Vorgang, der zur Schädigung und Krankheit der Gewebe führt, sondern, wie sich gleicherweise experimentell beweisen läßt, auch eine Reaktion zum Schutze des Organismus, und zwar nicht nur gegen körperfremde, sozusagen von außen eindringende Schädlichkeiten, wie z. B. die Bakterien, sondern auch gegen Schädlichkeiten, die aus den Körperzellen selbst hervorgehen, nämlich die entarteten wachsenden Zellen der bösartigen Geschwülste.

Man weiß durch die Entdeckungen Warburgs, daß der Stoffwechseltyp der bösartigen Geschwulstzellen sich von dem Stoffwechseltyp aller normalen Körperzellen grundlegend dadurch unterscheidet, daß die normalen Körperzellen als Energiequelle lediglich die Atmung besitzen, und deshalb zugrunde gehen müssen, wenn ihnen der Sauerstoff entzogen wird, daß dagegen die Geschwulstzellen neben der Atmung auch die Fähigkeit besitzen, durch Spaltung Energie zu gewinnen, und deshalb auch bei vollkommenem Sauerstoffabschluß leben und wachsen können. Ja es war sogar wahrscheinlich, daß die Fähigkeit der Geschwulstzellen, durch ihre Spaltung bei Sauerstoffabschluß Energie zu gewinnen, geradezu die Voraussetzung ist für ihr bösartiges Wachstum im Körper.

In früheren Abschnitten wurde gezeigt, daß die Größe der aeroben Glykolyse beispielsweise der Leukocyten, des geschädigten Peritoneums oder des arbeitenden Muskels, bestimmt wird durch die Zucker-, Bicarbonat-, Wasserstoffionenkonzentration des Milieus, während die Atmung sich relativ unabhängig von diesen Faktoren verhielt. Dieselbe Gesetzmäßigkeit läßt sich für den Krebsstoffwechsel nachweisen. Schnitte von menschlichem Lymphosarkom und von *Jensen-Rattensarkom* wurden in *Ringer-Lösungen* untersucht, in denen jeweils die Zucker-, Bicarbonat- und Wasserstoffionenkonzentration variiert wurde. Da verschiedene Schnitte auch des gleichen Tumors oft etwas abweichende Stoffwechselzahlen ergaben, wurde für alle Variationen des jeweils untersuchten Milieufaktors immer der gleiche Schnitt verwendet. Die Atmung der Geschwulstzellen ist unabhängig von dem Bicarbonat- und Zuckergehalt und von der

Wasserstoffionenkonzentration innerhalb der untersuchten Grenzen von $p_H = 6,2$ bis $p_H = 7,5$. Die aerobe Glykolyse hingegen wird von jedem einzelnen dieser Faktoren wesentlich beeinflusst, so daß es möglich ist, durch p_H - und Bicarbonatvariationen, nicht nur durch Zuckerentziehung, was selbstverständlich ist, die Tumorglykolyse zu verhindern. Stoffwechselmäßig verhält sich also die Tumorzelle in einem bicarbonatarmen und sauren Milieu wie eine normale Körperzelle, d. h. sie gewinnt ihre Energie lediglich durch Atmung.

Daß der Entzündung als Abwehrreaktion des Körpers gegen die bösartigen Geschwülste, etwa im Sinne einer Hemmung der Energiebeschaffung des Tumors und damit vielleicht einer Hemmung des Wachstums, eine Bedeutung zukommen muß, war wahrscheinlich, wenn man bedenkt, daß unter den Bedingungen der Entzündung nicht nur ein einzelner dieser Faktoren, die die Glykolyse beeinflussen, wirksam ist, sondern alle 3 Faktoren gleichzeitig. Ich habe in einer früheren Arbeit über Krebsstoffwechsel und Entzündung¹² gezeigt, daß die Entzündung nicht nur eine Beeinflussung des Stoffwechsels der Tumorzellen bewirkt, sondern daß die Bedingungen einer Entzündung durch diese Stoffwechselveränderung den Tod der Tumorzelle herbeiführen. Ich untersuchte Schnitte von menschlichen und tierischen Carcinomen in von Menschen gewonnenen entzündlichen Flüssigkeiten (Cantharidin-Hautblasenflüssigkeit und Pleuraexsudaten) und fand unter diesen Bedingungen der Entzündung eine Abnahme der aeroben Glykolyse bei konstanter Atmung. Als Kontrollmedium wurde Serum bzw. eine zuckerhaltige Normalringerlösung benutzt. Nach 3-, 6- und 16stündigem Aufenthalt im Serummilieu oder im entzündlichen Milieu wurde das darin suspendierte Tumorgewebe herausgenommen und sein Stoffwechsel in einer frischen Zucker-Ringerlösung gemessen. Es ergab sich nach Wiederherstellung des optimalen Milieus bereits nach 3–6stündiger Einwirkung der entzündlichen Flüssigkeit auf das Tumorgewebe, daß nicht nur die aerobe auch in gleicher Weise die Atmung vermindert ist: die Entzündung hatte also zu einer irreversiblen Schädigung der Tumorzelle geführt. Wurden nach 16stündigem Aufenthalt des Tumorgewebes in der entzündlichen Flüssigkeit wieder optimale Bedingungen hergestellt, so war weder eine Atmung noch eine Glykolyse mehr nachweisbar, d. h. das Tumorgewebe war abgestorben.

Der Körper besitzt also in den Reaktionen der Entzündung ein Mittel, die degenerierten Zellen der bösartigen Geschwülste abzutöten, und man kann andererseits die Entstehung des Krebses, des ungehemmten Wachstums degenerierter Zellen, nach diesen Befunden erklären als Folge einer verminderten entzündlichen Reaktionsfähigkeit des Körpers.

VII. Wirkungen der Entzündung auf Bakterien. Es wurde in den vorigen Kapiteln gezeigt, wie es mit Hilfe der von Warburg geschaffenen zellphysiologischen Methoden gelingt, isolierte Körperzellen oder Gewebsschnitte, während sie dem Einfluß pathologischer Bedingungen ausgesetzt sind, zu beobachten und ihre Reaktionen quantitativ zu messen. Auf

diese Weise war es möglich, neben die Anatomie der Entzündung, der wir die genaue histologische Kenntnis der Zustandsbilder verdanken, die Zellphysiologie der Entzündung zu setzen; neben die morphologische Frage nach den Veränderungen der Zellzusammensetzung oder des Aussehens der Zellen die physikalisch-chemische Frage nach den Reaktionen, die als Ursache oder Folge dieser anatomisch faßbaren Veränderungen am Ort der Entzündung stattfinden.

Auch für die Bakteriologie war durch die von *Warburg* geschaffene Methodik eine neue Forschungsrichtung gegeben. Denn die manometrischen Methoden machen es möglich, auf einfache Weise die Bakterien während ihres Lebens und Wachstums zu beobachten und ihre hauptsächlichsten Lebensäußerungen unter den verschiedensten Bedingungen quantitativ an den Änderungen der Gasdrucke zu messen (Sauerstoffverbrauch und Kohlensäurebildung bei der alkoholischen Gärung, Kohlensäure- und Wasserstoffbildung bei der Buttersäuregärung). Daß diese neue Forschungsrichtung sich gerade auch für Untersuchungen an Bakterien als fruchtbar erwiesen hat, bedarf kaum eines Hinweises mehr; es sei nur erinnert an die Arbeiten von *Warburg* selbst mit Hefebakterien, die zur Entdeckung der chemischen Konstitution des Atmungsferments geführt haben.

Klassifiziert man die Bakterien nach den Reaktion, durch die sie die zum Leben notwendige Energie gewinnen, so sind nach *Pasteur* zu unterscheiden

- A. die Bakterien, die ihre Energie durch Atmung gewinnen
- B. die Bakterien, die ihre Energie durch Spaltung gewinnen, und
- C. die Bakterien, die durch beide Reaktionen, Atmung und Spaltung, ihre Energie gewinnen können.

Klassifiziert man die Bakterien nach ihrem Verhalten gegen Sauerstoff, so sind zu unterscheiden

- 1. die strengen Aerobier, d. h. die Bakterien, die lediglich bei Anwesenheit von Sauerstoff leben und wachsen können. Diese Gruppe 1 der Einteilung der Bakterien nach ihrem Verhalten gegen Sauerstoff ist identisch mit Gruppe A der Einteilung der Bakterien nach der Art ihrer Energiegewinnung; Bakterien, die nur durch Oxydation ihre Energie gewinnen, können ohne Sauerstoff nicht leben.

- 2. Die sog. „fakultativen“ Aerobier und Anaerobier sind Bakterien, die sowohl bei Gegenwart, wie Abwesenheit von Sauerstoff leben und wachsen können, sie sind unabhängig vom Sauerstoff: denn einerseits brauchen sie den Sauerstoff nicht, da ihnen ihr Spaltungsstoffwechsel für Leben und Wachstum ausreichende Energiemengen liefert, gleichgültig ob sie neben oder anstelle des Spaltungsstoffwechsels auch durch Atmung Energie gewinnen können, und andererseits ist der Sauerstoff ihnen nicht schädlich, wie den strengen Anaerobiern (Gruppe 3). Mit der Einteilung der Bakterien nach der Art ihrer Energiegewinnung verglichen entsprechen diese fakultativen Anaerobier und Aerobier also den

Bakterien der Gruppe C (atmenden *und* spaltenden Bakterien) und einem Teil der (ausschließlich spaltenden) Bakterien der Gruppe B. Der andere Teil der Bakterien der Gruppe B (spaltenden Bakterien) wird nach seinem Verhalten gegen Sauerstoff bezeichnet als

3. strenge Anaerobier, d. h. Bakterien, die lediglich bei Abwesenheit von Sauerstoff leben und wachsen können. Dieses Verhalten der Bakterien gegen Sauerstoff läßt sich bisher in keiner Weise erklären. Bei einer Anzahl von spaltenden Bakterien wirkt der Sauerstoff eben aus bisher unbekannten Gründen als „Gift“, d. h. bei Anwesenheit von Sauerstoff wachsen diese Bakterien nicht und gehen zugrunde.

Den Einfluß eines entzündlichen, d. h. eines kaum noch Sauerstoff und Zucker enthaltenden, sauren Milieus auf Bakterien habe ich bereits in einer früheren Arbeit behandelt¹³. Es ergaben sich nach den verschiedenen Arten der Energiegewinnung und dem verschiedenen Verhalten gegen Sauerstoff notwendig folgende Wirkungen auf die verschiedenen Bakteriengruppen.

Die strengen Aerobier, d. h. die Bakterien, die nur durch Atmung leben können (Gruppe A), werden zwar aus Mangel an Nahrungsmaterial nicht zugrunde gehen, da sie neben der Oxydation von Zucker noch die Möglichkeit haben, Fette und Eiweißkörper zu verbrennen. Sie müssen aber zugrunde gehen infolge der mit fortschreitender Entzündung zunehmenden Anaerobiose, da sie durch den Abschluß des Entzündungsraumes den zur Fett- oder Eiweißverbrennung notwendigen Sauerstoff nicht mehr erhalten.

Den zuckerspaltenden Bakterien bietet die Entzündung keineswegs günstigere Bedingungen als den Aerobiern: denn mit fortschreitender Entzündung wird der Zuckergehalt des entzündlichen Milieus gleich null, infolgedessen müssen die Bakterien, die lediglich Zucker spalten können, im Milieu der Entzündung absterben.

Es ist also deutlich, daß allein nach den Gesetzen des Energiebedarfs die Bedingungen der Entzündung den „Tod“ der meisten Bakterien herbeiführen. Denn der größte Teil der Bakterien lebt durch Atmung oder Zuckerspaltung oder durch beide Reaktionen nebeneinander und kann daher weder wachsen noch seine für den Körper schädlichen Wirkungen ausüben, wenn diese energieliefernden Reaktionen, die die Voraussetzung der Tätigkeit aller Lebewesen bildet, unterbrochen werden.

Es ist freilich nicht notwendig, daß alle Bakterien, die eine bestimmte Zeit lang keinen Stoffwechsel mehr gehabt haben, auch im biologischen Sinne endgültig abgestorben sind; denn fast immer lassen sich z. B. aus Eiter noch Bakterien herauszüchten, die unter optimalen Bedingungen wieder alle typischen Eigenschaften und Wirkungen der betreffenden Bakterienart besitzen. Sogar aus einem so abgekapselten Milieu wie dem verkalkter tuberkulöser Drüsen gelingt es, virulente Tuberkelbacillen zu kultivieren. Maßgebend für den Zustand des Organismus ist aber nicht nur die manchen Bakterien erhalten bleibende *potentielle* Fähigkeit

zur Wiederaufnahme ihres Stoffwechsels und damit ihrer Pathogenität, sondern ihr *augenblickliches* Verhalten. Denn im Milieu eines abgeschlossenen Kalkherdes oder innerhalb einer entzündlichen Flüssigkeit können eben beispielsweise infolge der Sauerstoffentziehung und Zuckerverarmung die Bakterien ihren Stoffwechsel nicht ausüben, d. h. für den Gesamtorganismus sind sie, für den Augenblick jedenfalls, unschädlich. Man kann aus diesem Grunde mit den üblichen Methoden der bakteriologischen Züchtung und dem einzig entscheidenden Kriterium des Bakteriologen: Läßt sich in einem optimalen Milieu ein Bakterienwachstum erzeugen oder nicht? — über die aktuelle Schädlichkeit eines Bakteriums nichts feststellen. Gerade zur Beantwortung dieser Frage über den augenblicklichen Zustand, in dem sich ein Bakterium unter gegebenen Bedingungen befindet, ist es zweckmäßig, auch die Methoden der Stoffwechselmessung neben den üblichen bakteriologischen Methoden zu verwenden; denn diese können nur entscheiden, ob ein Bakterium vollständig getötet ist oder ob es noch die Fähigkeit hat, unter optimalen Bedingungen ein erneutes Wachstum zu beginnen. Die Form einer *vita minima*, eines Winterschlafs oder Scheintods der Bakterien ist vom Standpunkt des Bakteriologen aus gleichbedeutend mit Leben, für Gesundheit oder Krankheit des Körpers aber beinahe gleichbedeutend mit dem Tod oder Nichtvorhandensein der Bakterien. Wie ein solcher Scheintod eines Bakteriums bei völligem Abschluß jeder energieliefernden Substanz möglich ist, ist ebenso rätselhaft wie die Fähigkeit eines Getreidekorns, nach jahrtausendelangem Liegen in einer ägyptischen Grabkammer unter günstigen Lebensbedingungen wieder aufzukeimen. Für die Fragestellung dieser Arbeit ist aber nicht wichtig die potentielle Fähigkeit der Bakterien, sondern ihr tatsächliches Verhalten unter den Bedingungen einer Entzündung, und es wurde gezeigt, wie die Entzündung die Fähigkeit hat, durch Abschluß des bakteriell erkrankten Gebietes vom übrigen, gesunden Gewebe durch Erzeugung einer Anaerobiose und Verarmung des Entzündungsgebietes an energieliefernder Substanz sowohl die atmenden als die zuckerspaltenden Bakterien unschädlich zu machen.

Nur eine Bakteriengruppe gibt es, die geradezu erst durch die Bedingungen der Entzündung ihre Pathogenität für den menschlichen Körper erhält. Dies ist die Gruppe der strengen Anaerobier, und zwar derjenigen, die als Energiequelle nicht nur Kohlehydrate, sondern Eiweißstoffe angreifen. Für die strengen Anaerobier ist der Sauerstoff ein Gift, d. h. diese Bakterien wachsen nicht bei Sauerstoffanwesenheit, sondern gehen zugrunde. Im gesunden Körper gibt es für diese Krankheitserreger keine Lebens- und Wachstumsmöglichkeiten; denn überall ist das Gewebe mit Sauerstoff gesättigt und deshalb tödlich für Bakterien, denen der Sauerstoff schadet. Die Entzündung aber führt zur völligen Sauerstoffverarmung des erkrankten Gewebes, und hier im Entzündungs-

gebiet einzig und allein sind die Voraussetzungen gegeben, unter denen die strengen Anaerobier ihren optimalen Stoffwechsel ausüben können und wachsen. Könnten diese strengen Anaerobier nur durch Spaltung des Zuckers ihre Energie gewinnen, so kämen keine durch strenge Anaerobier hervorgerufenen Infektionskrankheiten zustande, denn wie wir gesehen haben, geht der Zunahme der Anaerobiose eine Abnahme des Zuckers im Entzündungsbereich parallel.

Wie aber die Abb. 12 zeigt, ist diese Gruppe der strengen Anaerobier, z. B. der *Bacillus tetani*, der wohl für die menschliche Pathologie wichtigste

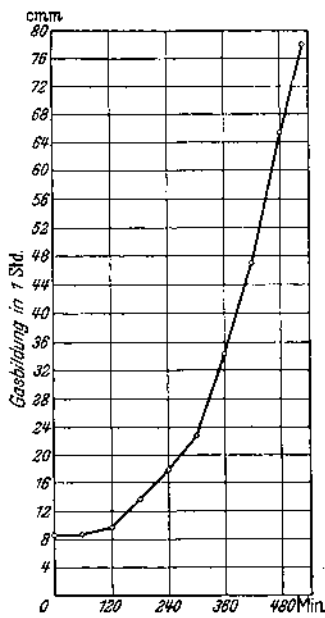


Abb. 12. Wachstum von Tetanusbakterien in zuckerfreier Ringer-Peptonlösung.

obligate Anaerobier, imstande, in einem lediglich eiweißhaltigen Milieu sich ausgezeichnet zu vermehren. Die Abnahme des Stoffwechsels dieser Bakterien unter Sauerstoff, also die Geschwindigkeit mit der bei Sauerstoffgegenwart diese Bakterien absterben, zeigt Abb. 13. Die Bakterien bilden mit dem Sauerstoff sozusagen Gifte, deren mit fortschreitender Einwirkung des Sauerstoffs zunehmende Konzentration schließlich den Stoffwechsel verhindert. Bringt man solche Bakterien, die der Einwirkung des Sauerstoffs beispielsweise 5 Stunden lang ausgesetzt waren, wieder in streng anaerobe Verhältnisse, so sieht man, wie ihr Stoffwechsel nur einen Bruchteil beträgt vom Stoffwechsel der Bakterien, die unter sonst gleichen Bedingungen bei Sauerstoffabschluß gelebt haben. Umgekehrt ist die Tatsache des Vorkommens einer Infektion mit streng anaeroben Bakterien, z. B. Tetanus, allein schon ein Beweis dafür, daß es im Körper überhaupt streng anaerobe Verhältnisse gibt, also einen völligen, jedenfalls funktionellen Abschluß irgendeines erkrankten

Gebietes vom übrigen, gesunden Organismus, mit einer Veränderung in der Konzentration nicht nur der festen Substanzen, sondern sogar der Gase.

Daß ein solcher Abschluß des entzündeten Gebiets vom gesunden Gewebe und die damit verbundene Veränderung der Stoffkonzentration in diesem Bereich den Stoffwechsel normaler und gesunder Körperzellen beeinflusst und damit auch die Funktion der in diesem Milieu befindlichen Gewebe, ließ sich quantitativ als Wirkung der Entzündung verfolgen. Ebenso konnte nachgewiesen werden, wie die Entzündung zum Absterben gewisser körperfremder Zellen führt, z. B. der Krebszellen, und wie auch eine Anzahl von Bakterien notwendigerweise im Milieu der Entzündung

zugrunde geht. Daß die Entzündung durch Unterbrechung des Sauerstoffzustroms von der Umgebung des betroffenen Gebietes auch die Voraussetzung schafft für das Wachstum der sauerstoffempfindlichen Bakterien und damit für das Zustandekommen beispielsweise des Tetanus, des Botulismus, des Gasbrands, wurde im letzten Kapitel gezeigt.

Außer den durch den Stoffwechsel der entzündlichen Zellen bewirkten physikalisch-chemischen Veränderungen der Stoffzusammensetzung im

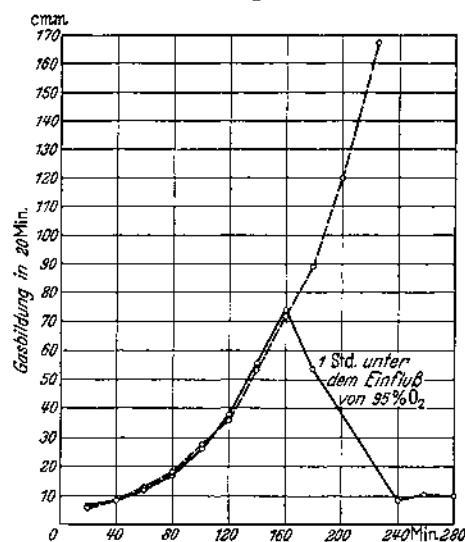


Abb. 13. Einfluß des Sauerstoffs auf strenge Anaerobier.

Entzündungsgebiet und den quantitativ mit diesen physikalisch-chemischen Veränderungen zusammenhängenden gesetzmäßigen Abhängigkeiten des Stoffwechsels und der Funktion der tierischen Körperzellen, der Geschwulstzellen und der verschiedenen Bakterienarten mag es noch viele andere, heute mit einer exakten Methodik noch nicht erfaßbare Erscheinungen im Ablauf einer Entzündung geben, besonders auch die verschiedenen Reaktionen, mit denen der Gesamtorganismus diese Veränderungen am Ort der Entzündung beantwortet. Doch wird man bei der Erforschung jedes bei der Entzündung auftretenden Phänomens immer die physikalisch-chemischen Veränderungen am Ort der Entzündung berücksichtigen müssen, und auch das klinische Handeln sollte diesen Befunden entsprechend erwägen, welche Wirkungen der Entzündung bei den jeweiligen Krankheitszuständen zu fördern oder zu bekämpfen sind.

Literatur.

- ¹ Bergmann, v.: Funktionelle Pathologie. Berlin 1932. — ² Warburg: Stoffwechsel der Tumoren. Berlin 1926. — Über die katalytischen Wirkungen der lebendigen Substanz. Berlin 1928. — ³ Kempner: Proc. Soc. exper. Biol. a. Med. **35**, 148 (1936). — ⁴ Kempner: J. cell. a. comp. Physiol. **10**, 339 (1937). — ⁵ Schlayer: Biochem. Z. **293**, 94 (1937). — ⁶ Kempner u. Peschel: Z. klin. Med. **114**, 439 (1930). — ⁷ Literaturverzeichnis bei Peschel: Klin. Wschr. **1930 I**, 1061. — ⁸ Barron and Harrop: J. of biol. Chem. **84**, 89 (1929). — ⁹ Warburg u. Kubowitz: Biochem. Z. **214**, 5 (1931). — ¹⁰ Kempner: J. of biol. Chem. **124**, 229 (1938). — Klin. Wschr. **1938 I**, 971. — ¹¹ Schlayer: J. Bacter. **31**, 181 (1936). — ¹² Rona u. Wilenko: Biochem. Z. **62**, 1 (1914). — ¹³ Meyerhof: Chemische Vorgänge im Muskel. Berlin 1930. — ¹⁴ Fletcher and Hopkins: J. of Physiol. **35**, 247 (1907).
-

*Zur Wirkung des Insulins auf die
Zuckerverwertung im Glykogenzerfall
[The Effect of Insulin on Sugar Utilization
during Pathologic Glycogen Breakdown]*

**The Effect of Insulin on Sugar Utilization
During Pathologic Glycogen Breakdown
by Ruth Lohmann**

In measuring the metabolism of gases in certain types of carbohydrate metabolism disorders that belong to the group of pathologic glycogen breakdown, we found that insulin is not able to correct or reduce the disturbance in sugar utilization. There is no increase in oxygen consumption, and, following administration of sugar, insulin is not able to elevate the low respiratory quotient to the level achieved under normal conditions.

*Sonderabdruck aus
„Zeitschrift für klinische Medizin“, 135. Bd., 4. und 5. Heft.*

Verlag von Julius Springer in Berlin W 9.

(Aus der II. Medizinischen Klinik der Charité, Berlin
[Direktor: Prof. Dr. G. v. Bergmann].)

Zur Wirkung des Insulins auf die Zuckerverwertung im Glykogenzerfall*. Gasstoffwechselversuche.

Von

Ruth Lohmann.

(Eingegangen am 1. Dezember 1938.)

In einer früheren Arbeit¹ wurde die Frage experimentell angegriffen, ob sich die beim Glykogenzerfall auftretende Störung der Zuckerverwertung² in irgendeiner Form auch im Gasstoffwechsel nachweisen läßt. Es wurde beim Kaninchen gefunden, daß nach Zuckerfütterung einerseits eine *Steigerung des Sauerstoffverbrauchs*, die eine Mehrverbrennung des Zuckers angedeutet hätte, *nicht* vorhanden ist, daß aber andererseits eine *Störung* zutage tritt im *Verhalten des Respiratorischen Quotienten (R. Q.)*, und zwar insofern, als die unter normalen Stoffwechselverhältnissen nach Zuckerzufuhr eintretende Erhöhung des R. Q. ausbleibt. Daraus mußte geschlossen werden, daß beim Glykogenzerfall der Zucker nicht nur nicht in höherem, sondern sogar in geringerem Maße in die Oxydationsprozesse des Körpers einbezogen wird als bei normalem Stoffwechselzustand. Dieser auffällige Befund war bis dahin nur beim Diabetes mellitus bekannt gewesen und galt als für diesen charakteristisch. Die oben genannten Versuche beweisen, daß dieser Befund weit allgemeinere Bedeutung hat und auch bei jedem extra-insulären Glykogenzerfall besteht.

Nach der heute über die Wirkungsweise des Insulins geltenden Auffassung müßte man erwarten, daß Insulin die Fähigkeit hat, diese Störung in der Zuckerverbrennung auszugleichen. Denn wie allgemein angenommen wird, fördert Insulin die Verwertung des Traubenzuckers in der Weise, daß es eine Erhöhung des Anteils der Zuckerverbrennung an den Gesamtverbrennungen im Organismus herbeiführt. Dies müßte sich also in einer Erhöhung des R. Q. äußern. Dementsprechend ist bei der Stoffwechselstörung des Diabetes mellitus auch gefunden worden, daß durch Insulin der sonst auch nach Zuckerzufuhr abnorm niedrige R. Q. auf normale Höhe gebracht wird³. Andere Untersucher haben gefunden⁴, daß beim Hunger, der ja eine dem Diabetes ähnliche Stoffwechsellaage hervorruft, ebenfalls durch Insulin der R. Q. nach Zuckerzufuhr ansteigt, was ohne Insulin nicht der Fall ist. Damit stimmen

* Prof. G. v. Bergmann zum 60. Geburtstag.

auch die Untersuchungen *Brentanos*⁵ überein, daß Insulin die Erschwerung der Glykogenbildung aus Traubenzucker im Hunger und bei Phlorrhizinvergiftung völlig wieder auszugleichen vermag. Diese Befunde sind insofern sehr einleuchtend, als die genannten Stoffwechselstörungen durch Insulinmangel hervorgerufen werden und demgemäß durch Insulin zu kompensieren sind.

Wie ist nun die Wirkung des Insulins auf die Zuckerverwertung bei anderen, nicht durch Insulinmangel hervorgerufenen Formen des Glykogenzerfalls? Wenn Insulin unter allen Umständen — wie bisher meist angenommen wurde — die Zuckerverwertung begünstigt, müßte dies im Gasstoffwechsel zum Ausdruck kommen, insbesondere im Verhalten des R. Q.

Es wurde daher der Gasstoffwechsel von Tieren, bei denen der Glykogenzerfall bzw. die Kreatinurie experimentell durch Thyroxin hervorgerufen wurde, und bei spontaner, d. h. aus unbekannten Ursachen entstandener Kreatinurie untersucht.

Die Versuchsanordnung und Methodik der Apparatur zur Gasstoffwechselmessung ist in einer früheren Arbeit¹ genau beschrieben, so daß hier darauf verwiesen werden kann. Die Versuche wurden an Kaninchen durchgeführt. Zunächst wurde bei jedem Tier im kreatinfreien Zustande Sauerstoffverbrauch und Kohlensäureabgabe nüchtern gemessen, dann nach Zuckerbelastung (5 g/kg durch die Schlundsonde, in 50%iger wässriger Lösung) bei gleichzeitiger Verabfolgung von 0,5 Einheiten Insulin pro 1 g Zucker subcutan. Jetzt wurde bei den so untersuchten Tieren eine Kreatinurie durch Thyroxin erzeugt bzw. gewartet, bis eine spontane Kreatinurie auftrat.

Tabelle 1. Einwirkung von Insulin + Zucker auf den Sauerstoffverbrauch vor und während einer Kreatinurie.

| Tier Nr. | Versuch Nr. | Kreatinurie? | Ursache der Kreatinurie | Nüchtern (N) oder nach Zucker + Insulin (Z + I) | Sauerstoff- verbrauch (ccm pro 100g und Stunde) |
|-------------|----------------|--------------|----------------------------|---|--|
| 3 | 148 | ∅ | Spontan | N | 56,5 |
| | 153 | + | | N | 54,7 |
| | 164 | ∅ | Spontan | Z + I | 58,5 |
| 1 | 159 | + | | Z + I | 58,0 |
| | 151 | ∅ | Spontan | N | 58,5 |
| | 144 | + | | N | 59,4 |
| | 162 | ∅ | Spontan | Z + I | 57,5 |
| 4 | 154 | + | | Z + I | 57,4 |
| | 158 | ∅ | Thyroxin | N | 57,5 |
| | 171 | + | | N | 83,2 |
| 5 | 160 | ∅ | Thyroxin | Z + I | 58,7 |
| | 173 | + | | Z + I | 84,1 |
| | 168 | ∅ | Thyroxin | N | 63,6 |
| | 172 | + | | N | 91,0 |
| | 180 | ∅ | | Z + I | 63,8 |
| | 188 | + | Thyroxin | Z + I | 89,5 |

Um die Wirkung des Insulins auf den Sauerstoffverbrauch zu messen, wurde bei den mit Thyroxin vorbehandelten oder spontan kreatinurischen Tieren zuerst der Sauerstoffverbrauch nüchtern gemessen, dann nach dieser Vorperiode (etwa 1 Stunde) Insulin + Zucker gegeben. Wie aus Tabelle 1 ersichtlich ist, *steigt der Sauerstoffverbrauch auf Insulin hin nicht an*, es tritt also keine erhöhte Verbrennung ein.

Auch bei der durch Thyroxin selbstverständlich hervorgerufenen Oxydationssteigerung ist durch die Insulin-Traubenzuckerdarreichung kein zusätzlicher Sauerstoffverbrauch eingetreten.

Betrachten wir nun das Verhalten des R. Q. (Tabelle 2), so geht daraus eindeutig hervor, daß auch hier die Insulinwirkung während der Kreatinurie versagt. Bei dem durch Thyroxin hervorgerufenen Glykogenzerfall und beim spontan bestehenden Glykogenzerfall *vermag Insulin den R. Q. kaum zu erhöhen*, d. h. die oxydative Zuckerverwertung wird in diesen Fällen nicht durch Insulin gefördert.

Tabelle 2. Einwirkung von Insulin + Zucker auf den Respiratorischen Quotienten vor und während einer Kreatinurie.

| Tier Nr. | Versuch Nr. | Kreatin- urie ? | Ursache der Kreatinurie | Nüchtern (N) oder nach Zucker + Insulin (Z + I) | Respira- torischer Quotient | Steigerung des Respiratorischen Quotienten durch Zucker + Insulin | |
|-------------|----------------|--------------------|----------------------------|--|-----------------------------------|--|-------------------------|
| | | | | | | ohne Kreatin- urie | mit Kreatin- urie |
| 1 | 143 | ∅ | Spontan | N | 0,74 | 23,3 | 2,8 |
| | 150 | + | | N | 0,72 | | |
| | 162 154 | ∅ + | Spontan | Z + I Z + I | 0,90 0,75 | | |
| 3 | 145 | ∅ | Spontan | N | 0,75 | 23,7 | 7,9 |
| | 155 | + | | N | 0,77 | | |
| | 164 170 | ∅ + | Spontan | Z + I Z + I | 0,94 0,82 | | |
| 5 | 168 | ∅ | Thyroxin | N | 0,72 | 23,8 | 12,9 |
| | 187 | + | | N | 0,75 | | |
| | 178 193 | ∅ + | Thyroxin | Z + I Z + I | 0,92 0,83 | | |
| 4 | 146 | ∅ | Thyroxin | N | 0,79 | 24,8 | 3,2 |
| | 149 | + | | N | 0,78 | | |
| | 157 174 | ∅ + | Thyroxin | Z + I Z + I | 0,98 0,81 | | |

Mit diesen Resultaten muß der Ansicht widersprochen werden, daß Insulin dasjenige Hormon sei, das die Zuckerverbrennung unter allen Umständen fördert. Diese Befunde der Gasstoffwechsellmessungen ergänzen sich mit den Ergebnissen *Brentanos*, der mit Hilfe von Glykogenbestimmungen festgestellt hat, daß beim thyroxinvergifteten Tier die Glykogenablagerung nach Zucker + Insulindarreichung keineswegs

zunimmt. Es wird also die Unwirksamkeit des Insulins hinsichtlich der oxydativen Zuckerverwertung bei dieser Form des Glykogenzerfalls von zwei ganz verschiedenen Ausgangspunkten her experimentell bewiesen.

Zusammenfassung.

Es wird mit der Methode der Gasstoffwechselformung gezeigt, daß bei bestimmten Störungen des Kohlehydratstoffwechsels, die zur Symptomengruppe des Glykogenzerfalls gehören, Insulin nicht imstande ist, die Störung der Zuckerverbrennung zu beheben oder zu bessern. Es tritt weder eine Erhöhung des Sauerstoffverbrauchs ein, noch vermag Insulin den niedrigen R. Q. auf die Höhe zu bringen, auf die er unter normalen Stoffwechselbedingungen nach Zuckerzufuhr stets ansteigt.

Literatur.

¹ Lohmann, R.: Klin. Wschr. 1937 II, 1682. — ² Brentano, C.: Z. exper. Med. 98, 677 (1936). — ³ Banting, F. G.: Trans. roy. Soc. Canada 1922, 35. — ⁴ Ringer, M.: J. of biol. Chem. 58, 483 (1923). — ⁵ Brentano, C.: Klin. Wschr. 1938 (im Druck).

***Manometrische Bestimmung von
Aminosäuren mit Ninhydrin im Warburg-Apparat
[Manometric Assay of Amino Acids with
Ninhydrin in the Warburg Apparatus]***

**Manometric Assay of Amino Acids with
Ninhydrin in the Warburg Apparatus
by Clotilde Schlayer**

Based on the color reaction of ninhydrin with the carboxyl groups of the alpha-amino acids, which liberates carbonic acid, a quantitative, gasometric micro-determination of amino acids had been developed.

This paper presents a slight modification of this assay, adapting it to the Warburg manometric methods.

Sonderabdruck
aus „Biochemische Zeitschrift“ 297, 395, 1938.
Verlag von Julius Springer, Berlin W 9.

Manometrische Bestimmung von Aminosäuren mit Ninhydrin im Warburg-Apparat.

Von
C. Schlayer.

(Aus der Medizinischen Klinik der Duke Universität, Durham, N. C., U. S. A.)

(Eingegangen am 17. Mai 1938.)

Mit 1 Abbildung im Text.

Die Tatsache, daß die Farbreaktion des Ninhydrins mit den Carboxylgruppen der α -Aminosäuren unter Freiwerdung von Kohlensäure verläuft¹, wurde von *van Slyke* und *Dillon*² zur Grundlage einer quantitativen gasometrischen Mikrobestimmung von Aminosäuren gemacht. *Van Slyke* und *Dillon* fanden, daß in wässriger Lösung bei p_H 5 oder darunter die Kohlensäure von den an die Aminogruppen gebundenen Carboxylgruppen in wenigen Minuten quantitativ abgespalten werden kann. Die Versuchsfüssigkeit wurde 3 Minuten lang schwach gekocht und die frei werdende Kohlensäure im *van Slyke*-Apparat³ gemessen. Nach *van Slyke* erscheint die Reaktion spezifisch für die Carboxylgruppen der Aminosäuren. Andere organische Säuren wie Essig-, Milch- oder Citronensäure geben keine Kohlensäure ab. Peptide und Harnsäure reagieren nicht mit Ninhydrin. Jede der natürlichen Aminosäuren einschließlich des Prolins gibt 1 Molekül Kohlensäure ab, die Dicarbonsäuren Asparagin- und Glutaminsäure geben 2 Moleküle ab; ebenso Cystin⁴.

Diese Aminosäurenbestimmung mit der Ninhydrinmethode läßt sich mit geringen Modifikationen auch mit dem *Warburg*-Manometer⁵ ausführen. Der Meßfehler ist gleich dem Ablesungsfehler $\pm 0,5$ mm Brodie, die Genauigkeit bei Verwendung von Versuchsgefäßen von etwa 15 ccm Rauminhalt, einer Flüssigkeitsmenge von 0,5 bis 1 ccm und einer Ablesungstemperatur von 38° C gleich 1,3 cmm Kohlensäure, also z. B. bei Alanin 0,005 mg.

Als Versuchsgefäße dienen die üblichen *Warburg*schen einsatzlosen Kegelgefäße mit Anhangsbirne. Versuchsgefäß und Manometer müssen durch einen Kapillarrhahn getrennt sein, so daß die Manometersperrflüssigkeit von Druckänderungen während des Kochens unabhängig

¹ *Ruhemann*, J. Chem. Soc. 99, 792, 1486, 1911; *Grassmann* u. *von Arnim*, Ann. d. Chem. 510, 288, 1934. — ² *Van Slyke* u. *Dillon*, Proc. Soc. Exp. Biol. u. Med. 34, 362, 1936; *C. R. Trav.*, Lab. Carlsberg, 22, 480, 1938. — ³ *Van Slyke*, *Page* u. *Kirk*, J. of biol. Chem. 102, 635, 1933. — ⁴ *Mason*, Biochem. J. 32, 719, 1938. — ⁵ *Warburg*, Stoffwechsel der Tumoren. Berlin, Julius Springer, 1926.

bleibt. Der Gasraum des Gefäßes, ebenso wie Anhangsbirne und Manometerschliffe sind durch eine einfache Kühlumkleidung geschützt. Diese beginnt 5 mm oberhalb der Versuchsflüssigkeit und besteht aus einem enganliegenden dünnwandigen Gummischlauch (2 mm innerer Durchmesser), durch den während der Kochzeit eisgekühltes Wasser geleitet wird. Das Kochen geschieht durch vorsichtiges schräges Eintauchen des die Versuchsflüssigkeit enthaltenden Teiles des Gefäßes in ein Glycerinbad von ungefähr 140°C . Der Hauptraum des Gefäßes enthält 0,5 bis 1 ccm Versuchsflüssigkeit. Wegen des Kochens im Manometergefäß sollte nicht mit größeren Flüssigkeitsmengen gearbeitet

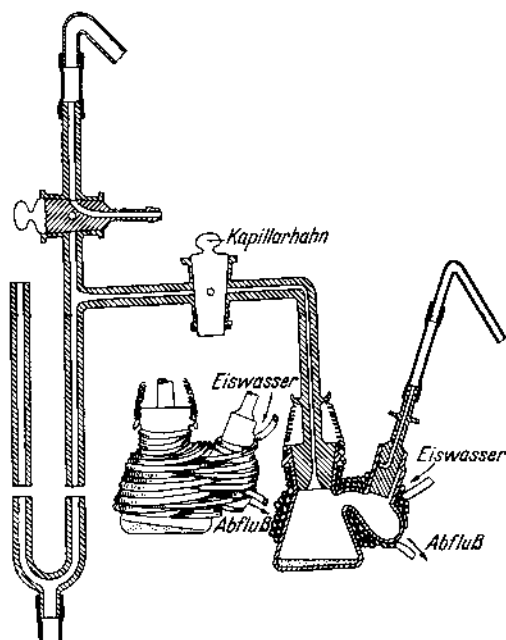


Abb. 1.

werden. Die Versuchsflüssigkeit wird durch Zugabe von 100 mg KH_2PO_4 pro ccm angesäuert. Die Anhangsbirne enthält 25 bis 50 mg Ninhydrin in Substanz. Die Manometergefäße werden mit Stickstoff gesättigt. Nachdem Druckkonstanz eingetreten ist, wird das Ninhydrin aus der Anhangsbirne in den Hauptraum eingespült und das Phosphat-Aminosäuren-Ninhydringemisch nach Schließung des Kapillarrhahns 3 Minuten lang vorsichtig gekocht. Die nach Wiedereinhängung in den Thermostaten und Öffnung des Kapillarrhahns abgelesene Druckdifferenz entspricht, mit der Gefäßkonstanten multipliziert, der freigewordenen Kohlensäure in cmm. Um sich zu vergewissern, daß die Reaktion

Manometrische Bestimmung von Aminosäuren mit Ninhydrin usw. 397

beendet ist, kann das 3 Minuten lange Kochen ein zweites Mal wiederholt werden.

Handelt es sich um sehr geringe Mengen von Aminosäuren, so empfiehlt sich eine Kontrolle mit Ninhydrin und aminosäurefreier Versuchslösung sowie 3 Minuten langes Kochen der Aminosäurelösung *vor* dem Einkippen des Ninhydrins. Doch ist der Fehler bei Unterlassung dieser Kontrollen, soweit es sich um Salzlösungen handelt, unbedeutend.

Will man das Kochen in den Manometergefäßen vermeiden, so kann man die Ninhydrin-Aminosäurenbestimmung auch bei Körpertemperatur ausführen. Allerdings ist die Reaktion des Ninhydrins bei 38° C z. B. mit m/80 d, l-Alanin erst nach 5 Stunden zu 90 %, nach 8 Stunden vollständig beendet. Diese langsame Methode der Ninhydrin-Aminosäurenbestimmung ist, da Umfüllung und Enteiweißung der Versuchslösung dabei wegfällt, z. B. bei Versuchen über Desaminierung von Aminosäuren durch Gewebsschnitte angezeigt. Nach Beendigung des Stoffwechselversuchs werden die Gewebsschnitte aus dem Gefäß herausgenommen, die Versuchslösung mit KH_2PO_4 (in Substanz zugegeben) angesäuert, Ninhydrin in den Anhang gegeben, mit Stickstoff gesättigt und nach kurzer Ausgleichszeit das Ninhydrin in die Versuchslösung eingespült.

***The Effect of Variations of Atmospheric Oxygen
Concentration upon the Metabolism of Tubercle Bacteria***

THE EFFECT OF VARIATIONS OF ATMOSPHERIC OXYGEN
CONCENTRATION UPON THE METABOLISM OF
TUBERCLE BACTERIA

BY

WALTER KEMPNER

Department of Medicine, Duke University, Durham, N. C.

PROCEEDINGS OF THE AMERICAN PHYSIOLOGICAL SOCIETY,
Toronto, Canada, 1939

REPRINTED FROM THE AMERICAN JOURNAL OF PHYSIOLOGY
Vol. 126, No. 3, p. P553, July, 1939

PROCEEDINGS OF THE AMERICAN PHYSIOLOGICAL SOCIETY,
Toronto, Canada, 1939
Reprinted from THE AMERICAN JOURNAL OF PHYSIOLOGY
Vol. 126, No. 3, p. P553, July, 1939

The effect of variations of atmospheric oxygen concentration upon the metabolism of tubercle bacteria. WALTER KEMPNER (introduced by G. S. Eadie). Department of Medicine, Duke University, Durham, N. C.

The respiratory metabolism of 15-20 days old cultures of tubercle bacteria H 37 grown on Steenken-Smith medium was measured at 37.5°C. manometrically by the Warburg method in M/80 glycerol-M/50 phosphate (pH 7.4) solution at 14 different oxygen concentrations between 0.1 and 100 per cent of one atmosphere (oxygen partial pressures of 0.76 to 760 mm.Hg). Two and one-half liters of N₂/O₂ mixtures of different concentrations, prepared over mercury, were used for saturation. Insufficient oxygen diffusion from gas space to cell surface was ruled out as a limiting factor by determinations at various shaking speeds (90-220 oscillations per minute). The experimental periods were of 2 to 24 hours. The rate of respiration was found to be nearly maximal at an oxygen partial pressure of 90 mm.Hg, the increase at higher oxygen tensions (150-760 mm.Hg) being only 6 per cent. On the other hand a decrease of oxygen tension below 90 mm.Hg caused a very marked drop in the bacterial respiration rate. At 60 mm.Hg the respiration dropped by 18 per cent, at 38 mm.Hg by 27 per cent, at 15 mm.Hg by 58 per cent and at 8.4 mm.Hg by 70 per cent. The respiratory quotient was constant at 0.75 for all oxygen tensions applied. The experiments show that the respiration of tubercle bacteria is highly dependent on variations of oxygen partial pressure, especially at those pressures actually occurring in the body.

Since the oxidative metabolism is practically the only source of energy for the tubercle bacillus, the inhibitory influence of low oxygen tension on its respiration will cause "starvation" and thereby a decrease of the injurious effects of the bacillus. This may explain the beneficial effect of various forms of treatment of tuberculosis (high altitudes, thoracoplasty, pneumothorax, phrenic paralysis), since in all these cases there is a lowering of oxygen partial pressures in the diseased tissue and consequently decreased metabolism of tubercle bacillus.

Oxygen Tension and the Tubercle Bacillus

OXYGEN TENSION AND THE TUBERCLE BACILLUS

BY
WALTER KEMPNER

REPRINTED FROM
THE AMERICAN REVIEW OF TUBERCULOSIS
VOL. XL, No. 2, AUGUST, 1939

Reprinted from *THE AMERICAN REVIEW OF TUBERCULOSIS*
Vol. XL, No. 2, August, 1939

OXYGEN TENSION AND THE TUBERCLE BACILLUS¹

WALTER KEMPNER

The study of the energy supplying reactions of the tubercle bacillus under the physicochemical conditions occurring in tuberculosis may be of value in answering the question as to the mechanism by which the body spontaneously and under various forms of treatment combats the injurious action of tubercle bacilli. We are too accustomed to general explanations, such as, that the curative effect of high altitudes is due to the purity of air, radiated by a greater intensity of ultraviolet light; to the stimulating action of reduced oxygen pressure on the blood forming tissues "so that the blood is quickly regenerated after haemorrhage;" and to a rise in serum calcium (1, 2, 3). Or that the value of collapse therapy is due to the relaxation and resting of the lung, and to production of lymph stasis in the diseased part, "thus preventing spread of the disease and allowing nature to effect a cure" (4, 5). What we hear of the "defence reactions" of the body is mainly concerned with descriptive anatomy, that is to say, we are shown such states as tubercula, fibrosis or calcification without learning how these changes affect the organism which has caused them.

At least one experimental approach to this complex problem is afforded by the methods of cellular physiology. They enable us to obtain quantitative data on how anatomical cell conditions, as well as various forms of treatment, directly influence the vital chemical reactions of the tubercle bacillus, which may be assumed to be proportional to its injurious effects within the body. Both the defence reactions of the patient, and the therapies mentioned above, have in common the lowering of the oxygen tension in the tissue involved. This is obvious for high altitudes as well as for conditions of artificial pneumothorax, phrenic paralysis and thoracoplasty. Quantitatively it has been proved for areas of experimentally produced sterile inflammation, where the metabolism of the leucocytes leads to a decrease of oxygen tension dependent upon the amount of white blood cells present and the duration of the inflammation period (6).

¹From the Department of Medicine, Duke University School of Medicine, Durham, North Carolina.

The lowest figure found in this series of experiments was an oxygen tension (oxygen partial pressure) of 6 mm. Hg, corresponding to an oxygen concentration of 0.8 vol. per cent of one atmosphere.

But the question that must be answered is: does this condition of lowered oxygen tension affect the tubercle bacillus, and in what way? Nearly all investigators (7, 8, 9, 10, 11) agree that the tubercle bacillus belongs to the strictly aerobic bacteria; when inoculating liquid culture media the pellicles are preferably placed in the upper layers, and, if the cultures (12) are kept in complete absence of oxygen at body temperature for three weeks, they perish, unable to obtain their life-sustaining energy by anaerobic fermentative splitting. Loebel, Shorr and Richardson (13) have shown that, through splitting of sugar to lactic acid anaerobically, the tubercle bacillus can obtain only one four hundredth of the energy gained by oxidation of sugar in air. This finding, in the view of the authors, explains the effect of tubercula and, according to Goldberg (14), the effect of collapse therapy on the bacillus. But though there may be complete absence of oxygen within a calcified tubercle, we are not justified in assuming this to be true for the lung tissue in high altitudes and in artificial pneumothorax (15). The *amount* of oxygen required by the bacillus probably will always be available under these conditions; the main difference is in the oxygen *tension*.

Webb, Boissevain and Ryder (8) examined the influence of oxygen and carbon dioxide on the growth of the human tubercle bacillus. They found that tubercle bacilli require an atmosphere containing a fairly high percentage of oxygen in order to grow, oxygen being the only gas required in appreciable amounts. No growth was observed (in 2 per cent glycerol broth) at 4 vol. per cent oxygen, and at 8 vol. per cent oxygen growth still was doubtful. Novy and Soule (9) examined glycerol agar cultures of tubercle bacilli inoculated by means of a spatula. The tubes were loosely plugged and placed in jars of 2 to 20 liters capacity containing the same amounts but different concentrations of oxygen. The oxygen consumption of the growing cultures was measured by determining the oxygen concentrations in the jars after a period of growth of twenty-eight to forty-two days. After twenty-eight days gas analysis of four jars with initial oxygen concentrations of 5.3, 2.9, 1.0 and 0.5 vol. per cent showed oxygen concentrations of 0.43, 0.41, 0.21 and 0.36 vol. per cent respectively; after forty-two days the oxygen concentration was zero in all the jars. Optimal growth was seen at 40 to 50 vol. per cent, but growth continued "until the last atom of oxygen was consumed."

The influence of oxygen tension on the respiration of cell suspensions containing equal amounts of cells which did not grow during the time of the experiment was quantitatively determined for the first time by Warburg (16, 17). By direct measurements he examined the oxygen consumption of phosphate suspensions of *Micrococcus candidans*, for example, at temperatures of 1° to 10°C. The manometer vessels were rotated at high speed to assure optimal gas diffusion to the surface of each single coccus. The same rate of oxygen consumption was found at an oxygen tension as low as 10^{-5} atmosphere (oxygen concentration of 0.001 vol. per cent) as in air. Since the publication of Warburg's experiments it has been considered an established fact that the *respiration of bacteria and body cells is independent of variations of oxygen tension, cell respiration remaining unchanged as long as the smallest amount of oxygen is left*. Opposite results which seemed to indicate a dependence of cell respiration on oxygen tension were criticized (16, 17, 18, 19) as being vitiated by the technical error of insufficient oxygen diffusion. Even at last year's meeting of the American Physiological Society, in a special symposium on anoxia, it was again emphasized (R. W. Gerard) that oxygen tension as such could in no way be considered as a limiting factor of cellular respiration.

We have, however, examined numerous body cells and bacteria at low oxygen tensions by methods which exclude the possibility of insufficient gas diffusion (20, 21, 22) and found that, contrary to the "all or nothing theory of cellular respiration," there is a considerable effect of oxygen tension on respiration. But this effect is influenced by changes of the milieu (salt content, carbon dioxide concentration, temperature) to such an extent that the whole phenomenon easily could be overlooked under unfavorable experimental conditions. At body temperature and in a physiological milieu the respiration of all normal uninjured young animal cells and bacteria examined proved to be very markedly inhibited by low oxygen tension. The respiration of *Micrococcus candidans* for example, which at 12°C. was the same at an oxygen tension lowered to 15 mm. Hg as in air, at 37°C. was inhibited by 60 per cent. Since this effect of oxygen tension, though quantitatively varying with the type of cell, was found in cells differing as widely in type as nucleated red blood cells of fowl and cold-blooded animals, human erythroblasts and leukaemic blood cells, kidney slices, pneumococcus, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas pyocyanea*, *Monilia albicans* and young plant cells, it might seem justifiable to draw a general conclusion

on all cellular respiration. But the tubercle bacillus is exceptional in many respects; its respiration is independent of pH changes within such wide limits as between 1.5 and 12 (13, 23). One could therefore not simply assume its sensitivity to variations of oxygen tension to be identical with that of cells previously examined.

This paper gives the results of experiments in which the respiration metabolism of the tubercle bacillus was measured manometrically with the Warburg technique at 14 different partial pressures of oxygen.

EXPERIMENTAL

Tubercle bacilli, H37,² cultivated on Steenken and Smith medium (24), were used. The cultures were fifteen to twenty days old. The bacteria were washed from the solid culture medium and suspended in m/50 phosphate (P_H 7.4)–m/80 glycerol solution. The dry weight was determined after centrifuging aliquot parts of the suspension fluid and drying at 100°C. (25). One cc. of suspension fluid contained 7 to 15 mg. bacteria.

Two cc. of the suspension fluid were pipetted into a conical Warburg manometer vessel of 18.5 cc. capacity. To absorb the carbon dioxide in the oxygen consumption experiment, the side bulb of the vessel contained 0.2 cc. of 10 per cent sodium hydroxide, which for the determination of the respiratory quotient was removed and replaced by 0.2 cc. m/20 lactic acid. The temperature of the water bath was 37.8°C. In order to assure optimal gas exchange between gas space and each cell under observation, the manometer vessel was shaken at a speed of 210 oscillations per minute. Controls showed that regardless of the oxygen tension employed, increase of the shaking speed did not alter the results, nor did decrease of the shaking speed to 90 oscillations per minute, at an oxygen tension as low as 2 vol. per cent, cause any change in the manometrical readings.

The manometer vessels with the suspensions were saturated with air and shaken in the thermostat for one hour. Then the respiration of the tubercle bacilli was measured in thirty-minute periods at definite oxygen tensions. The vessel was saturated with nitrogen-oxygen mixtures of different concentrations which were prepared over mercury in a gasometer of two and a half liters capacity. (See figure 1.) The manometer was not removed from the thermostat during the experiments and was

² My most cordial thanks are due to Dr. E. R. Baldwin, Trudeau Foundation, who kindly provided me with the cultures.

stopped for only ten seconds to open and to close the stop-cocks; otherwise the vessel was constantly shaken during the saturation (four minutes), as well as when the readings were made (every five minutes). After four constant readings a new gas mixture was passed through the vessel. During the whole time of the experiment the tubercle bacilli showed no growth and no diminution of their metabolic activity; the rate of oxygen consumption in air was exactly the same in the beginning and at the end of the experiment, even after experimental periods of twenty-four hours.

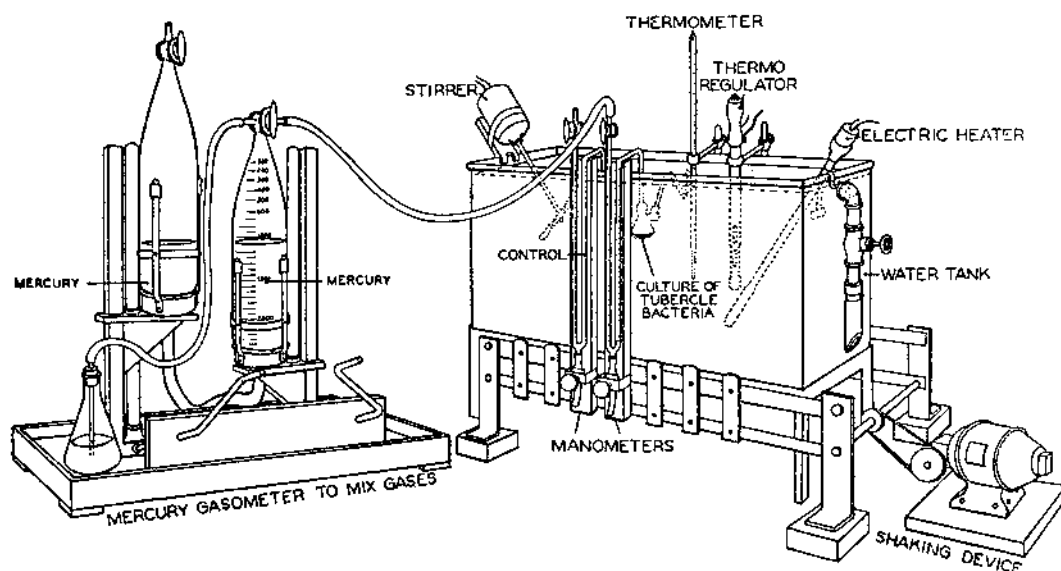


FIG. 1

Chart 1 shows the results of a typical experiment.

The rate of respiration of the tubercle bacilli reaches nearly its maximum at oxygen concentrations between 12 and 14 vol. per cent of one atmosphere (oxygen partial pressures between 91 and 106 mm. Hg). Further increase of the oxygen concentration, 20 to 100 vol. per cent (152 to 760 mm. Hg), produces only an increase of about 6 per cent. A definite inhibition, as compared with the rate of respiration in air, occurs, however, at an oxygen concentration as high as 8 vol. per cent (60.8 mm. Hg); the inhibition is 20.4 per cent. At 5 vol. per cent oxygen (38 mm. Hg) it is 28 per cent; at 2 vol. per cent (15.2 mm. Hg) 58 per cent; at

1.1 vol. per cent (8.4 mm. Hg) 70 per cent. This shows that the respiration of tubercle bacilli is highly dependent upon variations of oxygen con-

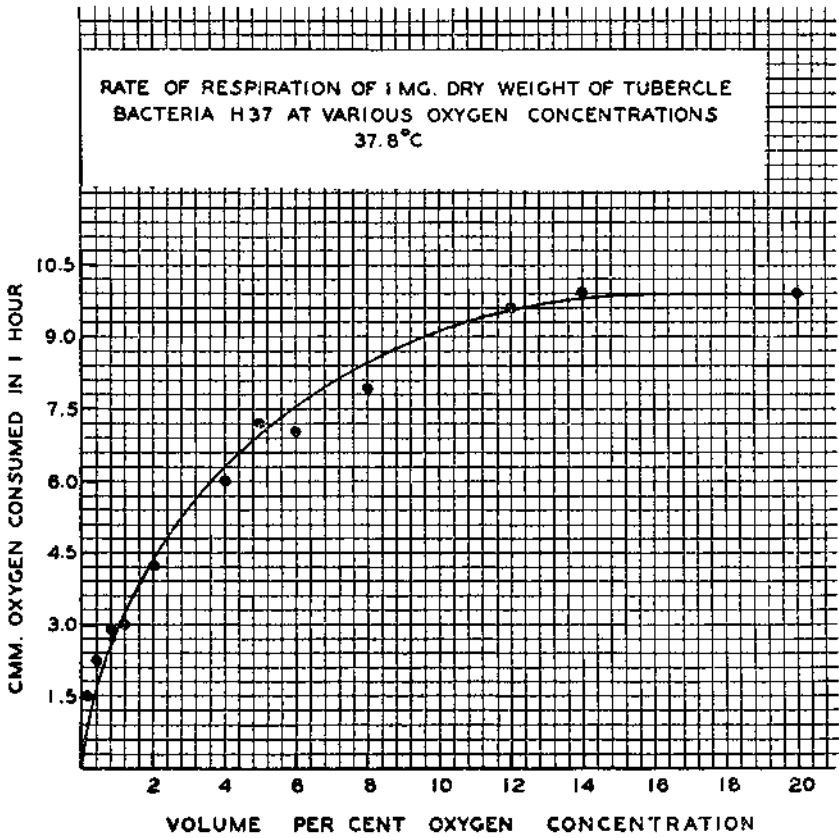


CHART 1

TABLE 1

Metabolism of 1 mg. (dry weight) of tubercle bacilli per hour at various oxygen tensions, at 37.8°C.

| MM. Hg OXYGEN PARTIAL PRESSURE | CMM. OXYGEN CONSUMED | CMM. CARBON DIOXIDE FORMED | RESPIRATORY QUOTIENT | PER CENT INHIBI- TION OF RESPIRA- TION |
|-----------------------------------|-------------------------|-------------------------------|-------------------------|--|
| 760-160 | 10.02 | 7.52 | 0.75 | 0 |
| 45.6 | 7.04 | 5.42 | 0.77 | 29.7 |
| 8.7 | 2.98 | 2.18 | 0.73 | 70.3 |

centration (oxygen partial pressure) especially at those oxygen concentrations that actually occur in the body. The oxygen saturation curve of the oxygen transferring ferment of respiration in the tubercle bacillus

is very similar in shape to that found for pneumococcus (21) and to the dissociation curves of oxyhaemoglobin (26).

Contrary to the experiences with nucleated blood cells (20, 22), the respiratory quotient remains almost constant for all oxygen tensions examined, in spite of the marked decrease of the respiration rate with lowered oxygen tensions. Table 1 shows the respiratory quotient at various oxygen tensions.

DISCUSSION

The finding that the respiratory metabolism, the main source of energy of tubercle bacilli, is a direct function of oxygen tension, makes it possible to discuss, at least from one clearly defined viewpoint, the mechanism of the fight of nature and medical treatment against the bacillus. We purposely limit this discussion to the inferences that can be drawn from the quantitative data presented above, and shall not speak here of other forms of treatment of tuberculosis, such as dietary measures, tuberculin treatment, etc. As the experiments have shown, the chemical reactions, and therewith the injurious effects of tubercle bacilli, are inhibited by low oxygen tension. If, on the basis of this result, one analyzes the mechanism of high altitude treatment in pulmonary tuberculosis, for example, and substitutes the figures obtained on the inhibition of bacterial respiration by low atmospheric oxygen concentration for the usual "pure air" hypothesis, interpretations and conclusions present themselves that also may be of value for problems of practical therapeutics.

At sea level the oxygen tension of atmospheric air is about $0.21 \times 760 = 159.5$ mm. Hg and that of alveolar air 100 mm. Hg; at 10,000 ft. altitude the atmospheric oxygen tension is $0.21 \times 540 = 113$ mm. Hg, the oxygen tension of alveolar air is about 62 mm. Hg (26, 27). What this difference in alveolar oxygen tension means for the tuberculous process in the body cannot simply be read from the curve (chart 1) which shows that the respiration of tubercle bacilli at 62 mm. Hg is inhibited by 20.4 per cent compared to their respiration at 113 mm. Hg. The oxygen tension to which the tubercle bacilli are exposed in the lung cannot, in the majority of cases, be assumed to be equal to that of alveolar air but rather to that beyond the alveolar wall. We must, moreover, include in our calculations the important factor of the reaction of the tissue, producing a leucocytic barrier around the invading bacillus (6);

this causes a further considerable lowering of the oxygen tension, since human leucocytes possess a very high respiratory metabolism (table 2).

Direct quantitative determinations of the oxygen tension within a tubercle have not been possible. But it is evident that the final oxygen tension within the tubercle must change with the variations of the initial oxygen tension in the alveolus. If we assume that the oxygen consumption of the surrounding tissue and of the leucocytic barrier causes 1 cc. of tissue fluid to lose in a given time 1.5 cmm. oxygen on the way between alveolus and tubercle, then the oxygen content within the tubercle would be at sea level $24 \cdot \frac{100}{760} - 1.5 = 1.66$ cmm. oxygen per cc., corresponding to an oxygen tension of 52.4 mm. Hg. At an altitude of 10,000 ft., when the initial alveolar oxygen tension is 62 mm. Hg, the oxygen content within the tubercle, under the premise of an equal amount of oxygen lost on the way, would be $24 \cdot \frac{62}{760} - 1.5 = 0.46$ cmm. oxygen

TABLE 2
Respiration in air of 1 mg. dry weight of cells in one hour

| TYPE OF CELLS | CMM. OXYGEN CONSUMED |
|------------------------------------|----------------------|
| Human exudate leucocytes: | |
| Mostly polynuclear cells (6)..... | 22.8 |
| Mostly lymphocytic cells (26)..... | 10.4 |
| Tubercle bacilli, H37..... | 10.7 |

per cc., corresponding to an oxygen tension of 14.5 mm. Hg. If we take into consideration the lower leucocyte (20) and tissue respiration rate probable at lower oxygen tensions, and hence assume the amount of oxygen lost on the way between alveolus and tubercle to be only two-thirds of that lost at higher oxygen tension, the oxygen content within the tubercle would be $24 \cdot \frac{62}{760} - 1.5 \cdot \frac{2}{3} = 0.96$ cmm. oxygen per cc., corresponding to an oxygen tension of 33.2 mm. Hg.

These calculations show that when the tuberculous process is going on behind the alveolar wall and a layer of leucocytes, the actual oxygen tension to which the tubercle bacilli are exposed would be at sea level 52 mm. Hg and at 10,000 ft. altitude between 33.2 and 14.5 mm. Hg. As seen in the curve, this difference in oxygen tension is followed by a very marked change in the rate of the energy yielding reactions of

tubercle bacilli. Assuming the cellular defence conditions to remain constant, the inhibition of the bacterial respiration would be only 20 per cent at sea level, but from 33 to 58 per cent at 10,000 ft. altitude.

The factor of the oxygen concentration in the air breathed, and accordingly of the initial oxygen tension in the alveolus, becomes increasingly important the more the defence reactions of the body, that is, the accumulation of white blood cells and the formation of fibrous tissue, have increased the amount of oxygen lost between the alveolus and the actual site of the bacillus. This is true especially for that region of the curve where a very steep drop in the bacterial metabolic reactions is seen.

On the other hand it is obvious that when the tuberculous lesion is in an area that always has a maximal supply of oxygen in concentrations above the level critical for tubercle bacilli, and when the body itself fails to produce any of the defence reactions that cause oxygen loss and lower the oxygen tension, low oxygen therapy alone will not be sufficient to inhibit the activity of the tubercle bacillus to any appreciable degree. It is also obvious that there is no reason for a treatment by means of which the alveolar oxygen tension is lowered when the defence reactions of the body have already produced a milieu in which the bacteria are asphyxiated by complete anaerobiosis, as in calcification. These are the two extremes where, from the point of view of the biology of the tubercle bacillus, low oxygen tension therapy becomes ineffective.

The same line of reasoning as in the instance of high altitude treatment can be employed for other forms of low oxygen tension treatment in pulmonary tuberculosis: for pneumothorax, thoracoplasty, phrenic paralysis, etc. It has to be modified for tuberculous lesions of other organs and of those areas of the lungs not lying in the immediate vicinity of the alveoli, in such a way that the oxygen tension of the blood and tissue fluid in between receives special consideration. Here one generally meets with the objection that lowering of the oxygen tension in the alveolar air does not influence the oxygen tension in the healthy or diseased organs, since the oxygen saturation of haemoglobin, with a decrease of oxygen tension from 100 to 62 mm. Hg for example, only decreases from 94 per cent to 86 per cent (26), and a marked drop does not occur until a much lower oxygen tension is reached. This objection is neither in agreement with the experimental results of Campbell (28, 29), who showed that the decrease of oxygen tension in the air breathed markedly decreases the oxygen tension in the tissues, nor does it consider the simple experience that, in spite of the well maintained oxygen saturation of

haemoglobin, the body reacts to high altitudes with such striking manifestations as mountain sickness and increased formation of red blood cells.

Likewise the argument fails to take into account the fact that the rate of metabolism of tubercle bacilli, as that of other bacteria and body cells, is not determined by the *amount* of oxygen available but by the actual oxygen *concentration*. The process follows the same pattern as in lactic acid formation by leucocytes, the rate of which depends on the sugar concentration in the suspension medium. The lactic acid formation drops to minimal values when fermentation takes place in 10 cc. of a 10 mg. per cent sugar solution instead of in 1 cc. of a 100 mg. per cent solution, although the absolute amount of sugar available to the leucocytes remains the same (30). Equally the oxidative metabolism of tubercle bacilli drops to minimal values when the oxygen concentration decreases from 10 vol. per cent to 1 vol. per cent, although the amount of oxygen available is kept constant. Regardless of the *amount* of oxygen carried by the haemoglobin in a given time, the maximum of the oxygen *tension* of the blood is always determined by the oxygen tension of the alveolar air.

The oxygen tension of the blood, on the other hand, determines the maximum oxygen tension of the tissue fluid with which the bacteria are in intimate contact at the site of the tuberculous lesion. Since oxygen is lost in the blood on the way from alveolus to capillary, as well as in the tissues before reaching the tubercle bacillus, it follows according to the calculations used above that the oxygen concentration around the tubercle bacillus will be correspondingly lower the lower the oxygen tension of the atmosphere, or of the alveolar air, or of the blood at the outset. As demonstrated for pulmonary tuberculosis, in the tuberculosis of other organs also, the treatment with low oxygen tension will not produce the decisive therapeutic effect of inhibiting the bacterial metabolism unless the local cellular reactions contribute to further decreasing the oxygen tension to such a degree that the bacillus is deprived of most of its energy supply, and thus is rendered harmless.

How low oxygen therapy influences the general condition of the patient and pathological manifestations secondary to the tuberculous process is not within the scope of this discussion, which is only concerned with the direct effect of the therapy on the tubercle bacillus itself. In this connection, however, it may be mentioned that high oxygen tension treatment, though it may afford symptomatic relief in many instances

OXYGEN TENSION AND THE TUBERCLE BACILLUS

167

of circulatory insufficiency secondary to the bacterial affection, raises the oxygen tension in the tissues (28, 29) and should therefore be applied unhesitatingly only in the two clinical types referred to above: first, where every form of causal therapy has to be abandoned, and second, where the body, by segregating the process, has by its own resources already overcome the disease, and the patient suffers from residual symptoms. In all other cases it must be remembered that high oxygen tension produces conditions most favorable for the metabolism of the tubercle bacillus and counteracts the efforts of the body to overcome the disease by inhibiting the bacterial reactions.

SUMMARY

The respiratory metabolism of fifteen to twenty day old cultures of the tubercle bacillus H37 was measured manometrically by the Warburg methods in m/80 glycerol-m/50 phosphate (P_H 7.4) at 14 different oxygen concentrations between 0.1 and 100 per cent of one atmosphere (oxygen partial pressures of 0.76 and 760 mm. Hg).

Contrary to the "all or nothing theory" of cellular respiration, the respiration of tubercle bacilli was found to be highly dependent on variations of oxygen concentration, especially at those concentrations that actually occur in the body. At 8 vol. per cent oxygen concentration the respiration was inhibited by 20.4 per cent, at 2 vol. per cent by 58 per cent, at 1.1 vol. per cent by 70 per cent. The oxygen saturation curve of the oxygen transferring ferment of respiration in the tubercle bacillus is very similar in shape to that found for pneumococcus and to the dissociation curves of oxyhaemoglobin. The respiratory quotient of the tubercle bacillus remained constant for all oxygen tensions applied.

Since the oxidative metabolism is practically the only source of energy for the tubercle bacillus, the direct inhibitory influence of low oxygen concentration on its respiration will cause "starvation," impairment of the chemical reactions and therefore a decrease of the injurious effects of the bacillus. The beneficial effect of various forms of treatment (high altitude, pneumothorax, phrenic paralysis, thoracoplasty) is discussed on the basis of this finding.

REFERENCES

- (1) STAEHELIN, R.: Die Tuberkulose der Lungen. In *Handb. d. inneren Medizin*, ed. by G. v. Bergmann and R. Staehelin, Berlin, 1930, vol. 2, p. 1652.
- (2) BURREL, L. S. T.: Recent advances in pulmonary tuberculosis, ed. 3, Philadelphia, 1937, pp. 204, 216.

- (3) HUDSON, B.: *Brit. J. Tuberc.*, 1937, *31*, 18.
- (4) KREHL, L. v.: *Behandlung innerer Krankheiten*, Leipzig, 1933.
- (5) BACMEISTER, A.: *Lehrbuch der Lungenkrankheiten*, Leipzig, 1931.
- (6) KEMPNER, W., AND PESCHEL, E.: *Ztschr. f. klin. Med.*, 1930, *114*, 439.
- (7) OBICI, A.: *Zentralbl. f. Bakt.*, 1896, *19*, 314.
- (8) WEBB, G. B., BOISSEvain, C. H., AND RYDER, C. T.: *Am. Rev. Tuberc.*, 1924, *9*, 534.
- (9) NOVY, F. G., AND SOULE, M. H.: *J. Infect. Dis.*, 1925, *36*, 168.
- (10) BALDWIN, E. R., PETROFF, S. A., AND GARDNER, L. U.: *Tuberculosis*, Philadelphia, 1927.
- (11) WELLS, H. G., AND LONG, E. R.: *The chemistry of tuberculosis*, Baltimore, 1932.
- (12) POTTER, T. S.: *J. Infect. Dis.*, 1935, *57*, 149; 1937, *60*, 88; 1939, *64*, 261.
- (13) LOEBEL, R. O., SHORR, E., AND RICHARDSON, H. B.: *Tr. 26th Annual Meeting Natl. Tuberc. Assn.*, 1930, p. 196; *Tr. 27th Annual Meeting Natl. Tuberc. Assn.*, 1931, p. 1; *J. Bact.*, 1933, *26*, 167.
- (14) GOLDBERG, B.: *Clinical tuberculosis*, Philadelphia, 1935.
- (15) PINNER, M.: *Ann. Int. Med.*, 1935, *9*, 501; In *Alexander's Collapse Therapy of Pulmonary Tuberculosis*, Springfield and Baltimore, 1937, pp. 44 and 69.
- (16) WARBURG, O.: *Ztschr. f. physiol. Chem.*, 1908, *57*, 1; *Ergebn. d. Physiol.*, 1914, *14*, 264; *Stoffwechsel der Tumoren*, Berlin, 1926; *Katalytische Wirkungen der lebendigen Substanz*, Berlin, 1927.
- (17) WARBURG, O., AND KUBOWITZ, F.: *Biochem. Ztschr.*, 1929, *214*, 5.
- (18) OPPENHEIMER, C.: *Die Fermente*, Leipzig, 1925, vol. II, p. 1402.
- (19) MEYERHOF, O.: *Chemische Vorgaenge im Muskel*, Berlin, 1930, p. 9.
- (20) KEMPNER, W.: *Proc. Soc. Exper. Biol. & Med.*, 1936, *35*, 148; *J. Cell. & Comp. Physiol.*, 1937, *10*, 339; *Proc. Am. Physiol. Soc.*, *Am. J. Physiol.*, 1938, *123*, 117; *J. Biol. Chem.*, 1938, *124*, 229; *Klin. Wchnschr.*, 1938, *17*, 971.
- (21) SCHLAYER, C.: *J. Bact.*, 1936, *31*, 181; *Biochem. Ztschr.*, 1937, *293*, 94.
- (22) KEMPNER, W., AND GAFFRON, M.: *Proc. Am. Physiol. Soc.*, 1939.
- (23) DIECKMANN, H., AND MOHR, H.: *Zentralbl. f. Bakt.*, 1933, *129*, 185.
- (24) STEENKEN, W., JR., AND SMITH, M. M.: *Am. Rev. Tuberc.*, 1938, *38*, 514.
- (25) PESCHEL, E.: *Klin. Wchnschr.*, 1930, *9*, 1061.
- (26) BARCROFT, J.: *The respiratory function of the blood*, Parts I and II, Cambridge, 1928.
- (27) SOMERVILL, T. H.: *J. Physiol.*, 1925, *60*, 282.
- (28) CAMPBELL, J. A., AND HILL, L.: *J. Physiol.*, 1924, *58*, 25.
- (29) CAMPBELL, J. A.: *Ibid.*, 1925, *60*, 20; *Physiol. Rev.*, 1931, *11*, 1.
- (30) LOHMANN, R.: *Ztschr. f. klin. Med.*, 1938, *135*, 316.

The Role of Oxygen Tension in Biological Oxidations

(Reprinted from Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology, Volume VII, 1939)

*The Role of Oxygen Tension in
Biological Oxidations*



WALTER KEMPNER

THE ROLE OF OXYGEN TENSION IN BIOLOGICAL OXIDATIONS

WALTER KEMPNER

When I was working on the problem of filtrable virus diseases in the Warburg Institute (1926-27), I found that the plasma of chickens infected with plague virus showed a particular kind of respiration which at that time I interpreted as due either to the metabolism of the plague virus itself or to a metabolism originating under the influence of the virus (1). The plasma of normal chickens did not respire, but Warburg (2) was subsequently able to produce a respiration in the plasma of chickens by prolonged asphyxiation, or by keeping them at a temperature of 37°C. for 90 minutes after death. The respiration in the plasma of plague virus chickens, the magnitude of which is approximately such that 1 cc. of plasma consumes in air as many mm³. oxygen as 600 million fowl erythroblasts, with an R.Q. of 0.85, was insensitive to cyanide and carbon monoxide, and, moreover, it could not be inhibited by octyl alcohol or urethanes. I wrote in this paper that in other respects as well, the virus-plasma respiration was different from the respiration of cells and cell extracts. For I had found that this respiration was *markedly dependent* upon oxygen tension (Table I) and in general, and especially in the

fusion cannot be ruled out as a limiting factor, i.e. in all those cases where only the surface of the liquid or of the tissue suspension is in equilibrium with oxygen of definite concentration, and not the surface of each individual cell.

The technical error of insufficient oxygen diffusion could easily be excluded in the experiments with virus plasma respiration; that the plasma was actually in equilibrium with the gas space was shown by altering the shaking speed of the manometer vessels, and the error of insufficient intracellular oxygen diffusion need not be considered here, since the respiration of this filtrable virus plasma is not bound to cellular structure, as is proved by its indifference to narcotics.

The rate of respiration in the plasma of plague virus chickens was essentially dependent on oxygen tension, and varied greatly with variations of oxygen tension not only between 4 and 20 volumes per cent, but also between 20 and 100 volumes per cent, similar in this to the rate of oxygen consumption of yeast maceration juice and of acetone yeast, which according to Meyerhof (10) at variations from 20 to 100 volumes per cent O₂ increases by 30-35 per cent. The increase of the plasma respiration rate at 100 volumes per cent O₂, as seen in Table I, was more than 130 per cent, the inhibition at 4 volumes per cent O₂ was 88 per cent (11). So it had been found that oxidation catalysts, separable from the cell and dependent on oxygen tension, may occur in the animal organism under certain conditions. But since this phenomenon of dependence on oxygen tension could not be reproduced in any of the numerous animal cells and bacteria examined then and previously, we had to assume, as Meyerhof did with regard to the yeast juices, that this plasma respiration was fundamentally different from cell respiration and represented the reaction of a particular kind of respiration ferment to which no significance attached in the respiration of animal cells and bacteria.

Today we know considerably more about oxidation catalysts that can be separated from the cell, since Warburg discovered and isolated the yellow ferments and, as he showed in 1932 (to anticipate the exact chronology), the rate of the isolated yellow ferment is very markedly dependent on variations of oxygen tension; at 760 mm.Hg the respiration rate was 4.8 times as high as at 38 mm.Hg (12). In the same paper, however, Warburg emphasizes again that the yellow ferment plays no decisive role in catalyzing respiration of cells.

As to cellular respiration, it is true that Meyerhof and Burk (13), Meyerhof and Schulz (14),

TABLE I

Effect of various oxygen concentrations on the respiration of 3 cc. of plasma of a chicken infected with plague virus. 40° C.

| Volumes p.c. of oxygen | 4 | 20 | 50 | 100 |
|-------------------------------------|-----|------|----|------|
| mm. ³ of oxygen consumed | 4.5 | 36.3 | 63 | 84.6 |

Warburg Institute, it was considered an unquestioned dogma that cell respiration is entirely independent of variations of oxygen tension (oxygen partial pressure, oxygen concentration—I use these terms interchangeably here) and continues at its optimal rate as long as the smallest amount of oxygen is still available. Warburg had apparently proved this in his experiments on sea urchin eggs (3) and on red blood cells of geese (4), and Oppenheimer had formulated this viewpoint in his handbook "Die Fermente" (5) in the sentence: "All observers agree that there is no true connection between the real oxygen tension with which the cell is actually in equilibrium and the rate of respiration." Earlier experiments on the subject, made before the introduction of the quantitative cell physiological methods, were criticized (4,5,6,7,8,9) as being vitiated by technical errors which always occur when the oxygen dif-

Burk (15) and Iwasaki, also in Meyerhof's Institute (16), described an exception to Warburg's law of independence of cell respiration on oxygen tension: the nitrifying bacterium *Azotobacter* which showed at 2 volumes per cent oxygen a decrease in the rate of respiration of 50 per cent compared to the rate of respiration in air. But the authors considered this result as an exceptional finding, valid only for *Azotobacter*, and so Meyerhof (8) quoting the above experiments wrote (1930) in a discussion of the oxygen requirements of the isolated muscle: "In the given formulae it is assumed that the rate of respiration of cells is independent of oxygen tension. This assumption corresponds to the general experience with the respiration of animal organs."

The "general experience" was Warburg's earlier work on sea urchin eggs (3) and red blood cells of birds (4), and mainly his experiments on "Respiration at Very Low Oxygen Tensions" (1929) in which he examined the respiration of *Micrococcus candidans* (17). Insufficient oxygen diffusion to the cell surface was excluded as a limiting factor. Warburg rotated the manometer vessels containing the bacteria suspended in Ringer-phosphate solutions in a water bath of 1°C. at a very high shaking speed, and found no difference between the rate of oxygen consumption in air and at 10^{-5} atmosphere. The low temperature was used for two technical reasons: first because at a low temperature the suspension fluid, due to the increase of the oxygen solubility, contains a greater amount of oxygen than at the same oxygen tension at higher temperatures, secondly, because, through low temperatures, growth of the bacteria during the course of the experiment can be prevented, and therefore one can be sure of working with a constant number of cells.

On the other hand, contrary to Warburg's all-or-nothing law of cellular respiration, a series of cells (18, 19), e.g. *Paramecia* and *Arbacia* eggs (20-23), yeast cells (16, 17, 24), luminous bacteria (25), *Sarcina lutea* (26), *Chlorella* (27) showed a certain dependence of respiration on oxygen tension. It must be noted, however, that some of these cells were of relatively large diameter and the effect of the variation of oxygen tension on respiration became evident only below 1 volume per cent of oxygen in the gas space of the manometer vessel, so that Gerard, who with his collaborators was the author of many of the papers just mentioned, concluded that it is impossible to decide how much of the inhibition found is due to the effect of oxygen tension on cellular respiration as such, and how much to insufficient oxygen diffusion (28). Even at last year's meeting of the American Physiological

Society, in the symposium on anoxia, Gerard emphasized again that in no way need oxygen tension be considered as a limiting factor of cellular respiration.

This was also a tenet of our laboratory when in 1931 R. Lohmann (29) examined the sensitivity of malignant tumor cells to oxygen tension and found a marked inhibition of the respiration in sarcoma slices at 3.3 volumes per cent of oxygen compared to their respiration in air. Convinced of the evidence of Warburg's *Micrococcus candidans* experiment (17) which we cited as the crucial one, we reported our contradictory result with the comment that in experiments with tissue slices, no matter how thin they be, the factor of insufficient oxygen diffusion cannot be excluded.

Even when in experiments with isolated cells of very small diameter (pneumococcus) we did find a dependence of respiration on variations of oxygen tension (30)—and indeed to such a degree that at 8 volumes per cent of oxygen the respiration was considerably inhibited and at 2 volumes per cent the respiration was only 25 per cent of the respiration in air—we interpreted this as an exceptional case which we tried to harmonize with Warburg's results by explaining the sensitivity to variations of oxygen tension in pneumococci as a specific characteristic of bacteria whose respiration is catalyzed not by the iron-containing respiration ferment phaeohaemin, but by the yellow ferment; on the other hand, Bertho and Glueck (31), varying the oxygen tension only between 10 and 100 volumes per cent, had not been able to find dependence of respiration on oxygen tension in other bacteria with yellow ferment respiration, *Bacillus acidophilus* and *Bacillus acidificans* Delbrückii. That the respiration of animal cells and of bacteria with iron-ferment respiration was independent of oxygen tension, we then still accepted as an indubitable fact notwithstanding the results with pneumococci.

Since the question of dependence of respiration on oxygen tension is a key-problem whose solution is of basic importance, not only for the physiology of respiration, but also for the relation between respiration and fermentative splitting processes in the cell (Pasteur reaction), it is quite understandable why Warburg repeatedly (32, 33) resumed the subject to confirm his theory (1931-1935). The most recent occasion for this was the statement of Bumm, Appel and Fehrenbach (1934) that although respiration is independent of oxygen tension, aerobic lactic acid formation is not (34), a result which was also reported by Laser (1937) on the basis of experiments with retina and chorion (35). The material of Bumm and his co-workers was the mucous membrane of guinea pig intestine, the respiration and aerobic lactic acid formation of which they examined in

THE ROLE OF OXYGEN TENSION IN BIOLOGICAL OXIDATIONS

271

sodium chloride phosphate and in Ringer bicarbonate respectively, at 10 and 100 volumes per cent O_2 .

The Warburg Institute replied to these experiments, in a paper by Leiner (33) to the effect that respiration and aerobic glycolysis of the guinea pig membrane had not been determined in the same suspension medium; also, that with tissue slices the factor of insufficient diffusion cannot be ruled out, and only isolated cells are suitable material for experiments on oxygen tension sensitivity. Leiner used cells with a very high respiration rate, the erythrocytes of rabbits poisoned with phenylhydrazine (Morawitz cells) (36), and examined them at optimal shaking speeds at $38^\circ C$.; small numbers of cells were suspended in sodium chloride bicarbonate solution. Aerobic lactic acid formation and respiration were measured manometrically at 5 to 6 volumes per cent of oxygen and in air. The rate of respiration as well as the rate of aerobic lactic acid formation remained unchanged regardless of the oxygen tension applied.

In the experiments with pneumococci (30) we had noticed that the dependence of respiration on oxygen tension is the greater, the younger the bacterial cultures that are used. In 48 hour old cultures examined in salt solutions not only was the absolute magnitude of respiration referred to dry weight of bacteria considerably decreased, but it was also hardly possible to find any dependence on oxygen tension. On the other hand the experiments with young pneumococci in a favorable culture medium were technically more difficult because, due to the handicap of possible growth, only short measuring periods were at our disposal, and there was always the danger that inhibiting growth, through lowering the temperature or diluting the suspension fluid with salt solutions without oxidation substrate, would at the same time create environmental conditions no longer optimal for the chemical reactions of the bacteria.

In view of these difficulties we began to examine systematically (37-45) a large number of young and old bacteria cultures in states of resting and growing, as well as isolated animal cells, tissue slices, tissue cell fragments and plant cells, and measured the effect of variations of oxygen tension on cellular metabolism under the various physiological and unphysiological conditions which we thought might influence the sensitivity of the reaction. The cells examined were red blood cells of fowls and cold-blooded animals, human erythroblasts and erythrocytes, mature and immature lymphatic and myeloid leucocytes, Morawitz cells of rabbits, kidney tissue slices and kidney cell fragments of rats and rabbits, tubercle bacilli, pneumococci, *Micrococcus candidans*,

Staphylococcus aureus, *Escherichia coli*, *Pseudomonas pyocyanea*, *Monilia albicans* and young pine needles.

Oxygen consumption and aerobic and anaerobic lactic acid formation were determined by Warburg's manometrical methods (6, 32), the chemical determination of lactic acid formation was done according to Fuerth, Charnas and Clausen with the modification of Friedemann and his co-workers (46-48), and the determination of amino acids in the experiments with kidney cells according to Van Slyke's ninhydrine method with the manometrical modification of Schlayer (49).

We took as our material first those cells with which Warburg had given experimental proof of his theory of independence of respiration on oxygen tension; we examined red blood cells of geese, Morawitz cells of rabbits and cultures of *Micrococcus candidans*, all under conditions identical with those of Warburg: *Micrococcus candidans* and bird erythroblasts at $1^\circ C$.; the Morawitz cells at $38^\circ C$. Our results were in complete agreement with Warburg's. The Morawitz cells examined at $38^\circ C$. at oxygen tensions between 3.8 and 20 volumes per cent as well as the blood cells of geese and the cultures of *Micrococcus candidans* examined at $1^\circ C$. at oxygen tensions between 1 and 20 volumes per cent and 0.1 and 20 volumes per cent respectively, showed no sensitivity to variations of oxygen tension.

But the question still remained whether these results necessarily had to lead to the conclusion Warburg drew from them, i.e., that they were definite proof for the theory of the independence of cellular respiration of oxygen tension; or whether perhaps one might not consider inadequate an experimental set-up in which only abnormal cells were examined under physiological conditions, and normal cells only under unphysiological conditions.

Proceeding from our experiments with pneumococci where we had learned that older bacterial cultures are much less sensitive to oxygen tension than younger ones, we had some doubts whether the erythrocytes of rabbits poisoned with phenylhydrazine were exactly suitable material to solve the problem, in spite of the opinion expressed by Warburg (32) that "of all animal cells we know, the Morawitz cells are the best experimental material for respiration experiments"; because these cells which, like other mammalian erythrocytes, have lost their nuclei, must be regarded as senile and degenerated cells in a state of dying-off. For the purpose of controlling the methods to be applied, it was, however, of great advantage to work with such cells, for the fact that in spite of their high rate of respiration, one can submit them to very low oxygen tensions without finding any change in their respiration or lactic acid

fermentation, seemed to indicate that in the technique employed oxygen diffusion difficulties played no role. Young cultures of *Micrococcus candidans* and nucleated red blood cells, on the other hand, are a most suitable material, typical for undamaged isolated normal cells. But what seemed doubtful here was whether they could be expected to display all their characteristic metabolic reactions when examined only at a temperature lowered to 1° or 0°C.

Warburg's method of examining the bird erythroblasts was based on the fact that the affinity of hemoglobin to oxygen greatly increases with lowered temperatures. He wrote on this subject (4): "According to Barcroft and King (50), blood at low temperatures gives up the chemically bound oxygen only at very low oxygen tensions. For goose blood this 'dissociation tension' is at 0°C. below 5 mm. oxygen, i.e. at 5 mm. oxygen the hemoglobin-oxygen combination is but very little dissociated. If we then allow erythroblasts of geese to use their chemically bound oxygen at 0°C., we know that the oxygen is consumed at a lower tension than 5 mm."

In his experimental procedure, then, Warburg took into consideration the fact that the affinity of hemoglobin to oxygen is greatly influenced by low temperatures, but took it for granted that the oxygen affinity of the oxygen transferring ferment of cellular respiration was entirely independent of temperature. This, however, is by no means true. Rather is the dissociation of the oxygen combination of the oxygen transferring ferment of respiration so much influenced by temperature, that it was possible to overlook the whole phenomenon of dependence of cellular respiration

on oxygen tension, if the experimental material, whether animal cells or bacteria, was examined only at temperatures of 1° or 0°C.

Examined under physiological conditions at 37° C., all nucleated uninjured blood cells and a great number of young bacteria, regardless of whether they are carbon monoxide and cyanide sensitive or not, i.e. whether their respiration is catalyzed by iron-containing phaeohaemin or by iron-free yellow ferment, show a decisive dependence of their respiration on variations of oxygen tension. For instance, the respiration of normal red blood cells of geese at 4.9 volumes per cent oxygen was inhibited by 49 per cent compared to that in air, and that of *Micrococcus candidans* at 2 volumes per cent was inhibited by 60 per cent. (Table II).

The shape of the oxygen saturation curve of the oxygen transferring ferment of respiration at various oxygen concentrations is shown by experiments with tubercle bacilli. Since they are relatively resistant organisms and their rate of growth is very slow, it is possible to examine them at 38°C. at a high shaking speed over a long period, up to 36 hours, and at the end of the experiment still to find a respiration rate in air practically identical to that at the beginning (43, 45). Therefore the same manometer vessel containing 1 to 2 cc. suspension fluid and 7 to 14 mg. bacteria can be successively saturated with many gas mixtures of varying oxygen concentrations without the bacteria showing either an irreversible decrease of their metabolism due to injury, or an increase due to growth. (Fig. I).

Most animal cells are, of course, more delicate, and it would be inadvisable to use them in this

TABLE II
Effect of lowered oxygen concentrations on respiration of various types of cells. 37.5° C.

| Type of cells | Oxygen concentration (volumes per cent) | Inhibition of respiration (per cent) |
|---|--|---|
| Normal human erythrocytes | 3.0 | 0 |
| Morawitz cells of rabbits | 3.6 | 0 |
| Blood cells of normal goose | 4.9 | 49 |
| Blood cells of anemic goose | 6.1 | 70 |
| Blood cells of patient with erythroblastic anemia | 4.9 | 57 |
| Blood cells of patient with myelogenous leukemia | 5.2 | 60 |
| Human myeloblasts | 7.9 | 48 |
| <i>Pneumococcus</i> Type I | 2.0 | 72 |
| <i>Micrococcus candidans</i> | 2.0 | 60 |
| <i>Staphylococcus aureus</i> | 3.4 | 60 |
| <i>Escherichia coli</i> | 3.4 | 50 |
| Tubercle bacillus H 37 | 4.0 | 40 |

THE ROLE OF OXYGEN TENSION IN BIOLOGICAL OXIDATIONS

273

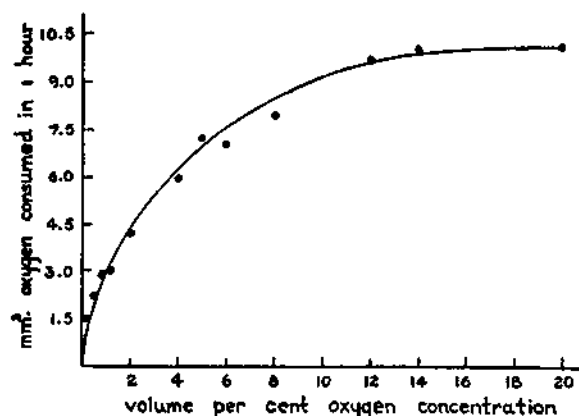


Fig. 1. Rate of respiration of 1 mg. dry weight of tubercle bacilli H 37 at various oxygen concentrations. 37.8° C.

kind of respiration experiment over periods longer than one or two hours. They are easily injured by cooling, centrifuging, high shaking speed, anaerobiosis, even of short duration, and by substitution of salt solutions for their original plasma. Blood cells of geese with marked anemia proved the most suitable material, whereas red blood cells of turkeys, chickens, alligators and bullfrogs were less resistant, changing their metabolism more readily as shown by decrease of respiration and gradual appearance of lactic acid formation in air. Such injured animal cells lose their sensitivity to variations of oxygen tension just as do old bacteria cultures. Their absolute rate of oxygen consumption, though, may remain relatively high and constant for a long time, as for instance in mature white blood cells of leukemic patients, but this oxygen consumption due to residual oxidative processes persisting or appearing after the cell has entered a state of dying-off, should not be mistaken for the true physiological cellular respiration, *i.e.* the oxygen consumption that is found in uninjured cells examined as soon as possible after being taken from the patient or experimental animal, and under conditions resembling those actually present *in vivo* as closely as possible. The unphysiological, though theoretically interesting, oxidative processes which outlast the perishing of cells and cell fragments under various artificial conditions *in vitro*, may prove indifferent to the influence of oxygen tension, but it would not be within the scope of this paper, which is exclusively concerned with the true physiological respiration, to discuss this indifference to variations of oxygen tension in other types of oxidative reactions, were it not for the reason that it provides another simple means of ruling out the error of insufficient oxygen diffusion, always to be suspected in experiments with lowered oxygen tension. For the rate of oxygen consumption in the

same cell suspension of mature leukemic leucocytes showed, in the first hour after the cells were removed from the body, a marked dependence on variations of oxygen tension which, however, by the third hour of the experiment, had completely disappeared.

The decided influence of temperature on the sensitivity of bacterial respiration to oxygen tension is demonstrated by Fig. 2. The curves show determinations of the respiration of *Escherichia coli* at different oxygen tensions at temperatures of 6.5°, 15.5°, 22.8° and 37.8° C. It is apparent that with lower temperatures the curves become steeper. At an oxygen tension *e.g.* of 0.9 volume per cent, the respiration is still the same as in air at 6.5° C., whereas at 37.8° C. it is inhibited by more than 50 per cent at an oxygen tension as high as 3.9 volumes per cent. At temperatures between 4° C. and 0° C. one must use extremely low oxygen tensions to find any inhibition of respiration at all.

Micrococcus candicans, even when very young cultures were used and examined in an otherwise physiological environment at 1° C., showed, as previously stated, exactly the same rate of respiration at 0.1 volume per cent oxygen and in air. At 38° C. it showed an inhibition of respiration of 60 per cent at an oxygen tension twenty times higher.

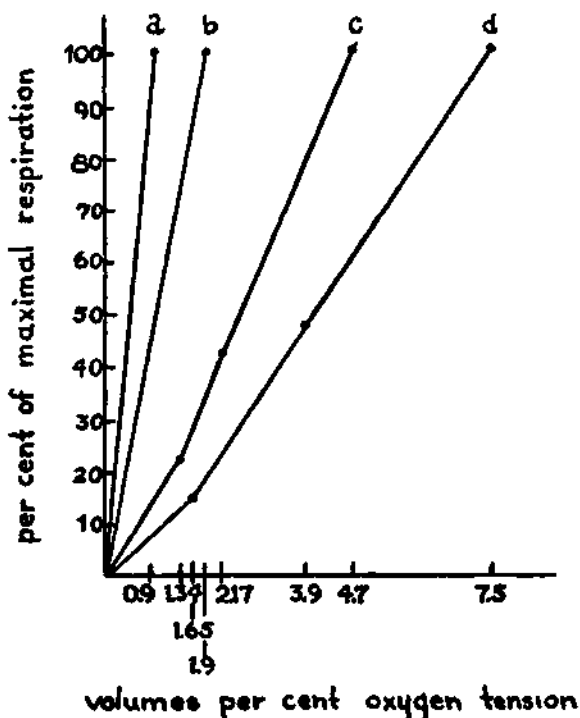


Fig. 2. Effect of temperature on sensitivity of respiration to variations of oxygen tension. *Escherichia coli*. (38) Curve a, 6.5° C. Curve b, 15.5° C. Curve c, 22.8° C. Curve d, 37.8° C.

The same sensitivity of the oxygen affinity of the respiration ferment to variations of temperature was seen in goose erythroblasts. At an oxygen tension of 3.8 volumes per cent the respiration at 38°C. was inhibited by 60 per cent as compared to air. At 26°C. the inhibition was only 22 per cent, at 10°C. no inhibition was found.

That the surface of the individual cell is really in equilibrium with the gas space of definite oxygen concentration, and that insufficient diffusion from the gas space to the cell surface is not a limiting factor in these experiments, is shown also by the controls with different shaking speeds, the experiments with mature leukemic leucocytes just mentioned, and by the experiments with the Morawitz cells. In the case of normal non-nucleated blood cells (human and rabbit erythrocytes) and of old bacterial cultures that also had proved insensitive to variations of oxygen tension, it might possibly have been said that here the oxygen tension effect failed to appear because the diffusion conditions were particularly favorable, since the absolute rate of respiration, referred to mg. cell weight per hour, was less than in nucleated cells or in younger bacterial cultures. This objection can be set aside, however, on the basis of the experiments with the Morawitz cells that have a respiration rate 40 times higher than normal rabbit and human erythrocytes, and 2 to 4 times higher than erythroblasts of geese.

Neither of these controls, however, can exclude the possibility of an insufficiency of intracellular diffusion. One could say that in non-nucleated cells the conditions for inner diffusion might for some reason or other be more favorable than in the nucleated cells, and that it was therefore fundamentally not the question of a *direct* effect of oxygen tension on the oxygen transferring ferment, but only of an *indirect* effect of decreased oxygen tension on the rate of respiration, in that the cell ferments, because of the blocking of the supply of oxygen required, were placed partly under aerobic, partly under anaerobic conditions, and that in this way decreased oxygen consumption was the final result. This objection could not be countered with controls obtained by applying even the greatest shaking speeds, as they would always merely concern the equilibrium between the cell surface and the surrounding medium, nor with the fact that cells like the experimentally damaged mature leucocytes, with a quantitatively constant but qualitatively changing respiration, or like the Morawitz cells, with a rate of respiration four times as high as that of the nucleated red blood cells of geese, are independent of variations of oxygen tension. Against this it could still be argued that the inner structure of these cells, and hence the intracellular diffusion conditions, were different, so that in one instance,

but not in the other, the necessary amount of oxygen reached the oxidation ferments at the right time. We would have been unable to decide this matter if the characteristic metabolism of the cells had not itself come to our assistance, and here again it was the nucleated blood cells, red blood cells of birds and cold blooded animals, human erythroblasts and white blood cells, that furnished excellent material, for in these cells we have a conspicuous indicator for the onset of anaerobic conditions at any time and place, namely the formation of large amounts of lactic acid. If, then, decreased oxygen tension inhibited the oxygen consumption because at some time and somewhere in the cell partial anaerobiosis occurred as the result of insufficient oxygen diffusion, this would have made itself manifest through increased lactic acid formation. As I have said, the cells were most cooperative in this whole matter, and without this cooperation it would not have been possible to give the desired proof with certainty, for it might well have happened that in the first place not only the complete absence of oxygen but even the lowering of the oxygen tension might have caused an increase in lactic acid formation, along with the inhibition of respiration, or secondly, that, as the Warburg-Meyerhof theory postulates (6, 7, 8) every decrease in respiration might have brought about a direct increase in the formation of lactic acid. The comparison with the non-nucleated Morawitz cells, experimentally damaged mature leukemic leucocytes, and the old bacteria cultures, as well as the independence of the results from shaking speed alterations, would perhaps have caused us to maintain our opinion that the phenomenon we had found was indeed due to the direct effect of oxygen tension on respiration, but we should not have been able to confirm this with quantitative data excluding the possibility of insufficient intracellular diffusion.

Fortunately the lowering of oxygen tension does not act reciprocally on respiration and lactic acid fermentation, *i.e.* lowered oxygen tension does not produce a corresponding increase in lactic acid formation simultaneously with the inhibition of respiration, nor do the nucleated blood cells react according to the Warburg-Meyerhof theory that lactic acid is formed whenever respiration is inhibited. Rather, it became evident that through lowered oxygen tension a great inhibition of respiration could be produced without any lactic acid formation occurring. In the manometrical determination, instead of a rise in the quotient (CO_2 formed / O_2 consumed) which must be expected when lactic acid is formed in a bicarbonate-containing medium, there was, on the contrary, a decrease of this quotient which, as seen in Table III and Table VI, proved to be a true decrease

THE ROLE OF OXYGEN TENSION IN BIOLOGICAL OXIDATIONS

275

TABLE III

Effect of lowered oxygen tensions on the metabolism of 100 mg. goose erythroblasts in one hour. 37.8° C.

| Volumes per cent of oxygen | mm. ³ oxygen consumed | mm. ³ carbon dioxide formed in respiration | R. Q. | mm. ³ lactic acid formed* |
|----------------------------|----------------------------------|---|-------|--------------------------------------|
| 19.3 | 65 | 58.5 | 0.9 | 6.6 |
| 7.7 | 65 | 58.5 | 0.9 | 6.4 |
| 5.9 | 57.5 | 49.7 | 0.865 | 6.9 |
| 4.9 | 33.2 | 6.7 | 0.202 | 6.2 |
| 3.8 | 22.8 | 0.59 | 0.026 | 5.9 |
| 1.6 | | | | 21.0 |
| 0 | 0 | 0 | 0 | 75.0 |

* 1 mm.³ = 0.004 mg.

of the respiratory quotient, revealing that at lowered oxygen tensions the respiration of the blood cells was also qualitatively changed.

Along with the manometrical determinations we determined the lactic acid formation chemically as well, at many different oxygen tensions and under various conditions and, in complete agreement with the manometrical experiments, obtained the unambiguous result that through decrease of oxygen tension the respiration of nucleated blood cells can be notably decreased, for instance by 70 per cent compared to the respiration in air, and that, notwithstanding, the cells fail to react with any kind of lactic acid formation (Fig. 3).

We still offered ourselves the rather far-fetched objection that in bird erythroblasts washed in salt solutions and suspended in Ringer-bicarbonate, the finding of the same lactate content after exposure to low oxygen tension as after exposure to air could be due to the fact that the supposedly anaerobic parts of the cells might indeed form lactic acid, but that this lactate might act on the aerobic cell parts as a particularly stimulating and

easily oxidizable substrate that would immediately be removed through oxidation, while cells kept in air would form no lactic acid and oxidize other substrates, so that the final result with regard to the lactate content would be identical under both conditions. If, however, the cells are not suspended in salt solutions but in plasma, this objection can be disregarded, since the normal lactate concentration of fowl plasma is so high to begin with (2 to 3×10^{-3} mol) that the increase, caused by the additional amount of lactic acid that might be formed, would be negligible. Besides, experiments in which erythroblasts were suspended in Ringer-bicarbonate solutions of different lactate concentrations gave no support to the assumption of varying substrate selection of these cells at varying oxygen tensions.

It is proved, then, by the fact that no lactic acid formation occurs at definitely low oxygen tensions in nucleated red and white blood cells, that one can considerably decrease the oxygen tension without producing any anaerobiosis within the cells; that is to say, that at low oxygen tensions, just as if the suspension were saturated with air or pure oxygen, not only the extracellular diffusion between gas space and cell surface but also the intracellular diffusion between cell membrane and chemical catalysts is sufficient to furnish the amount of oxygen required. Since, therefore, diffusion can be excluded as a limiting factor in these experiments, the decrease in cell respiration at low oxygen tensions can only be explained by a direct reaction of the oxygen of definite concentration with the oxygen-transferring ferment of respiration itself.

One more possibility of demonstrating that insufficient oxygen diffusion has no part in explaining the effect of oxygen tension on respiration was to change the chemical composition of the cell

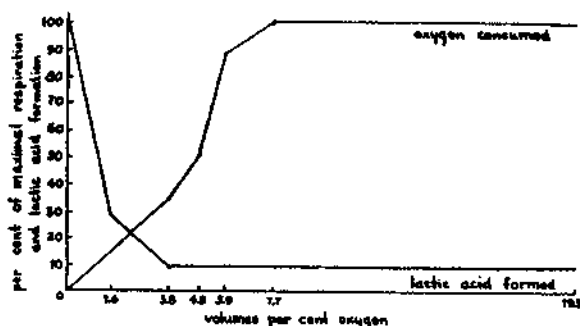


Fig. 3. Rate of respiration and lactic acid formation at various oxygen tensions. 37.8° C. (38).

milieu. The cells were either kept in their own plasma in the absence of carbon dioxide at an alkaline pH (NaOH in the side bulbs), or the physiological buffer-system bicarbonate-carbon dioxide was replaced by phosphate buffers of the same pH.

We know that the substitution of phosphates for physiological bicarbonate-carbon dioxide buffers is not an indifferent procedure but changes the course of reactions in a number of chemical processes in the cell. This may be illustrated by three examples. Warburg had found (32) that carbon monoxide (5 volumes per cent CO_2 /5 volumes per cent O_2 /90 volumes per cent CO) inhibits the respiration of the Morawitz cells by 67 per cent, an inhibition he observed with the same proportion carbon monoxide/oxygen also in yeast. That this inhibition was really due to the effect of carbon monoxide and not to the effect of the low oxygen tension was proved by a control with 5 volumes per cent CO_2 /5 volumes per cent O_2 /90 volumes per cent argon. This inhibition of respiration by carbon monoxide did not occur when the cells were examined in sodium chloride-phosphate instead of in Ringer-bicarbonate/ CO_2 . Warburg communicated this result with the following comment: "Similar phenomena in other cells have been the cause of controversies." (He refers here to a paper of Dixon and Elliot (51) who had examined the influence of cyanide on liver and kidney slices suspended in sodium chloride-phosphate and had found in this milieu only an incomplete inhibition of the respiration of those cells.) "This may teach us that if animal cells show a different behavior in sodium chloride solutions, they must be examined in their physiological salt milieu."

Another instance is the behavior of the respiration of rat retina to cyanide, reported by Laser (52). In contrast to most other animal cells, rat retina suspended in Ringer-bicarbonate showed a respiration entirely uninfluenced by M/100 cyanide. In phosphate the same cyanide concentration inhibited the respiration by 90 per cent, although in Ringer-bicarbonate the absolute magnitude of respiration was even greater.

A third example is in the experiments of Friedheim (53) who showed that pyocyanine, in the presence of phosphates, causes considerable increase in the respiration of normal rabbit kidney cells, and that this does not occur in Ringer-bicarbonate. From this finding Friedheim concludes that "in phosphate solution the oxidation mechanism of the cell is fundamentally different."

There is no doubt that phosphate buffer solutions are unphysiological for animal cells, and it is difficult to compare the processes observed in such solutions with those in the living cell. It would,

however, be wrong, as Gaffron points out (54), "to set aside the results obtained in phosphate solutions for this reason, and to accord them no value in forming our ideas on the course of cellular reactions." At any rate, metabolism investigations in phosphate, in addition to those in serum-bicarbonate-carbon dioxide or Ringer-bicarbonate-carbon dioxide, are necessary contributions toward the explanation of the mechanism of cellular respiration and fermentation and the relationship of one to the other. But the experiments on dependence of respiration on oxygen tension teach anew that one should not perform experiments in carbon dioxide-bicarbonate-free sodium chloride or phosphate solutions before the fundamental facts have been established in a physiological suspension fluid, preferably in the animal's own plasma.

Our experiments with nucleated red blood cells show that the affinity of oxygen to the catalyst of cellular respiration is essentially changed, not only by an alkaline carbon-dioxide-free milieu, but by the substitution of phosphate buffer for the physiological bicarbonate- CO_2 . Under these unphysiological conditions the respiration becomes so insensitive to variations of oxygen tension that, just as shown above for low temperatures, so also by working in phosphate instead of bicarbonate-carbon dioxide, the entire phenomenon of the dependence of cell respiration on oxygen tension was bound to escape observation. It was not the concentration of the phosphate, varied between M/15 and M/100, that was important, but rather the absence of the normal physiological composition of the suspension fluid. We found, *e.g.*, in sodium chloride-glucose-M/60 phosphate (pH 7.4) at 38°C., at an oxygen tension as low as 0.8 volume per cent, the respiration of erythroblasts of geese to be exactly the same as in air, while in sodium chloride-glucose-bicarbonate-carbon dioxide the inhibition of their respiration compared with that in air was of 60 per cent at an oxygen tension as high as 3.8 volumes per cent. The same differences were seen between the respiration of erythroblasts measured in alkaline carbon dioxide-free plasma and those measured in the unchanged physiological plasma containing 5 volumes per cent CO_2 . (Table IV).

It is, however, not for the question of the influence of environmental factors on the mechanism of cellular respiration that we discussed these experiments here, but for the question of oxygen diffusion. Since the same cells were examined at the same shaking speed, in the same proportion of cell volume to fluid volume and of fluid volume to gas volume (4 cc. to 15 cc.), with only the suspension media differing, a simple technique was at hand for excluding differences in either ex-

THE ROLE OF OXYGEN TENSION IN BIOLOGICAL OXIDATIONS

277

TABLE IV

Percentage of maximal respiration of goose erythroblasts in suspension media of different composition at various oxygen tensions. 38°C.

| Volumes per cent of oxygen | NaCl glucose M/60 phosphate pH 7.4 | Plasma alkaline | NaCl glucose | Plasma |
|----------------------------|--|-----------------|---|--------|
| | Carbon dioxide free (KOH in side bulbs) | | 2.5 × 10 ⁻³ mol NaHCO ₃ /5 p.c. CO ₂ | |
| 20 | 69 | 95 | 87 | 100 |
| 3.8 | 69 | 91 | 34 | 35 |
| 1.6 | 69 | | | 16 |
| 0.8 | 69 | | | |

tracellular or intracellular diffusion as a possible source of error. The role of oxygen tension as a *direct* determining factor in cellular respiration could thus again be definitely demonstrated.

Not all the cells which we examined were influenced in their sensitivity to oxygen tension by salt composition of the suspension medium, presence or absence of carbon dioxide, etc. We found, for instance, that a great number of bacteria, unlike the blood cells, showed a marked dependence of respiration on oxygen tension, whether bicarbonate-carbon dioxide or phosphate solutions were used. Also the sensitivity of the rate of deamination of amino acids in kidney cells toward variations of oxygen tension did not change whether the kidney slices or kidney cell fragments were examined in bicarbonate-carbon dioxide-containing, or in phosphate buffered, milieu.

The fact that the rate of respiration of nucleated blood cells examined under physiological conditions decreases considerably with lowered oxygen tension without any lactic acid being formed, was important because of the question of intracellular diffusion. We have to go back to this experimental result in considering the problem of the mutual relations between respiration and lactic acid fermentation. Since Pasteur's discovery that many cells form lactic acid in the absence of oxygen, not much advance has been made beyond the two experimental facts: first, that a great number of cells (most normal animal cells) show respiration and no lactic acid formation when examined in air or in pure oxygen, and second, that in the total absence of oxygen, *vis.* at an oxygen tension of zero, in nitrogen, hydrogen, carbon monoxide, argon, etc., when respiration, of course, is zero, lactic acid is formed in large amounts. These two facts have led to the conclusion that the occurrence of lactic acid formation is caused by a decrease in respiration, the assumption being that respira-

tion and lactic acid formation are reactions coupled in such a way that whenever respiration decreases, the cell tries to compensate, by an increase in lactic acid formation, for the amount of energy lost through the inhibition of respiration. A quantitative relation between the oxygen consumed and the lactic acid formed was shown in a number of cells (8), 1 molecule of oxygen causing 1 to 2 molecules of lactic acid to disappear.

The effect of cyanide and carbon monoxide on numerous cells seemed to give support to this interpretation (6, 7). For both in cyanide and in carbon monoxide, an increase in the splitting processes was always found together with the inhibition of cell respiration. If, for instance (39), erythroblasts of geese were examined at 5 volumes per cent CO₂/20 volumes per cent O₂ in 5 × 10⁻⁴ molar cyanide, and an inhibition of respiration of 62 per cent was found, the lactic acid formation which at the same oxygen tension in the absence of cyanide was zero, rose to 71 per cent of the maximal anaerobic fermentation. If, however, the same cells were examined in the absence of cyanide and respiration was decreased by exposing the cells to 6 volumes per cent oxygen instead of to air, then, in spite of a 70 per cent inhibition of respiration, no lactic acid formation appeared. (Table V).

If in both cases, in cyanide as well as at an oxygen tension of 6 volumes per cent one finds an inhibition of respiration of 60 to 70 per cent, but increased production of lactic acid only in the case of cyanide, one must discard inhibition of respiration as a determining factor in interpreting the mechanism of the Pasteur reaction and also that of the effect of cyanide. It then follows that the cause of the lactic acid fermentation which occurs in complete absence of oxygen is not that the cells no longer respire and therefore try to obtain their energy in another way, but that the

TABLE V

Respiration and lactic acid formation of 100 mg. of goose erythroblasts at low oxygen tensions and in cyanide. 37.8° C.

| Volumes per cent of oxygen | Mol. HCN | Respiration in 1 hour. (mm. ³) | Lactic acid formation in 1 hour. (mm. ³) | Inhibition of maximal respiration. (p.c.) | Maximal lactic acid formation. (p.c.) |
|----------------------------|--------------------|--|--|---|---------------------------------------|
| 19.3 | — | 179.0 | 0 | 0 | 0 |
| 19.3 | 5×10^{-4} | 68.3 | 61.7 | 62 | 71 |
| 6.1 | — | 53.0 | 0 | 70 | 0 |
| 0 | — | 0 | 86.8 | 100 | 100 |

lactic acid fermentation catalyst itself is directly or indirectly affected by the absence of oxygen; or *vice versa*, that the disappearance or non-appearance of lactic acid fermentation in the presence of oxygen is not due to Meyerhof's hypothetical resynthesis of 1 to 2 molecules of lactic acid through 1 molecule of oxygen consumed in respiration, but to the reaction of oxygen with the lactic acid fermentation catalyst itself, regardless of whether the oxygen is transferred by one of the catalysts of respiration (55, 56, 19) or by some other oxygen carrier in the cell. As shown by Fig. 3, a reciprocal relation between the oxygen affinity of the lactic acid fermentation ferment and the oxygen affinity of the respiration ferment does not exist.

On the other hand, if the inhibition of respiration through cyanide must be discarded as the cause of lactic acid formation in cyanide/air, then lactic acid formation in cyanide can only be explained by an effect of cyanide on the catalytic system of the lactic acid fermentation itself, occurring simultaneously with the inhibitory effect on the catalytic system of respiration or, as in some algae cells, even without it (57, 58). According to Warburg, the inhibitory effect of cyanide on respiration is due to a reaction of cyanide with the iron of one of the respiration catalysts, so that the combination of the respiration catalyst with oxygen is prevented. The effect of cyanide on lactic acid fermentation can be explained in the same way. Assuming that the lactic acid fermentation is inhibited under aerobic conditions by the reaction of one of the lactic acid fermentation catalysts with oxygen, the effect of cyanide on cellular metabolism would be due to the fact that not only the combination of oxygen with the respiration catalyst, but at the same time with the fermentation catalyst, is prevented.

Correspondingly the effect of other substances which change the reactions of cellular metabolism can be explained, *e.g.*, of carbon monoxide, ethyl cyanide, and phenosafranine. Carbon monoxide,

which inhibits respiration and increases lactic acid formation would, like cyanide, act by displacing the oxygen from the respiration ferment system as well as from the ferment system of lactic acid fermentation; ethyl cyanide and phenosafranine, which increase lactic acid fermentation without inhibiting respiration, would act exclusively with the ferment system of lactic acid fermentation (39).

In the field of abnormal cellular metabolism, *e.g.*, that of injured animal cells and cancer cells, our ideas on the mechanism of the relations between oxidative and fermentative splitting processes must also be modified by the fact that respiration can be appreciably inhibited by a decrease of oxygen tension without a corresponding increase in lactic acid formation. As Warburg has shown (6), normal undamaged animal cells do not form any lactic acid in air, whereas in the metabolism of benign tumor cells and more so in that of cancer cells, under the same aerobic conditions, a great amount of lactic acid is formed. This aerobic lactic acid formation is, however, not only seen in malignant tumors. It may be produced by cyanide, carbon monoxide, ethyl cyanide, as mentioned above, as well as by various injuries leading to the gradual death of the cell, or in more sensitive organs, simply by keeping the tissues in salt solutions instead of in their own plasma. Warburg explained the "aerobic" lactic acid formation of such cells as being caused by the insufficiency of inhibited or injured respiration, no matter whether this inhibition or injury of the cellular respiration catalyst takes place within or outside the body.

The abnormal metabolism type of exudate leucocytes which show, besides a high rate of respiration, a high lactic acid formation in air, was explained in the same way: that the exudate leucocytes were cells already dying off *within* the body; that the first sign of the dying-off of cells was injured respiration, and that this injured respiration could no longer master the lactic acid

THE ROLE OF OXYGEN TENSION IN BIOLOGICAL OXIDATIONS

279

TABLE VI

Metabolism of 1 mg. (dry weight) of myeloblasts per hour at various oxygen tensions (44). 2.5×10^{-2} M NaHCO_3 . 8.5×10^{-3} M glucose. 37.5°C .

| Oxygen tension (mm. Hg) | Oxygen consumed (mm. ³) | Carbon dioxide formed (mm. ³) | R. Q. | Lactic acid formed (mm. ³) | Inhibition of respiration (p.c.) |
|-------------------------|-------------------------------------|---|-------|--|----------------------------------|
| 760-160 | 7.7 | 5.8 | 0.75 | 0 | 0 |
| 60 | 4.0 | 0.95 | 0.24 | 0 | 48 |
| 45 | 3.22 | 0 | 0 | 0 | 58 |
| 0 | 0 | 0 | 0 | 11.5 | 100 |

formed, so that a large amount of lactic acid appeared even in air.

It is true that mature exudate and blood leucocytes of normal individuals and of patients with leukemia have a high rate of lactic acid formation, not only in complete absence of oxygen, but also in air; it is true, as was seen in human lymphoblasts (59, 60) and myeloblasts (61), that very young leucocytes also show a high lactic acid formation in complete absence of oxygen; none, however, in air. But curiously enough, by considerably inhibiting the respiration of these immature white cells, the myeloblasts, by lowered oxygen tension, the metabolism type of the mature leucocytes could nevertheless not be produced (44), *viz.* if through decrease in oxygen tension the respiration of the myeloblasts was inhibited by 58 per cent, lactic acid formation failed to occur in spite of the inhibited respiration. (Table VI). This makes it seem probable that the lactic acid formation which mature leucocytes, injured tissue, and tumor cells show in air and even in pure oxygen is not due to inhibited respiration but rather to a direct pathological change in their lactic acid fermentation ferment. That is to say, just as one could assume that the lactic acid formation in air caused by cyanide is due to a *reversible* blocking of the catalytic system of lactic acid fermentation, so that oxygen cannot react with it as long as the cell is poisoned, one could explain the metabolism type of tumor cells, injured body cells and mature leucocytes, as due to an *irreversible* change in the structure of this catalytic system, in such a way that its capacity of spontaneous reaction with oxygen has been lost once and for all.

After it had been established that oxygen tension has a decisive influence on the rate of respiration, *i.e.* on the sum of all oxidation processes which occur in the cell under normal conditions in a physiological medium, for instance in erythroblasts examined in blood plasma, it was interesting to see how this dependence of cellular respiration on oxygen tension might vary with variations

of the substrate in which oxidation takes place. We therefore measured the effect of oxygen tension on the oxidative deamination of amino acids in kidney cells (40-42) choosing this subject also because of its importance in clinical medicine, for it has been repeatedly stated, and with good reason, that in many diseases (in spastic, embolic and inflammatory processes of the kidney, in decompensated heart disease and hypertension, as well as in severe anemias) the kidney cells are poorly supplied with blood and hence with oxygen (62). Furthermore, the pathological conditions just mentioned were seen to lead frequently to renal insufficiency presenting the clinical picture of reversible uremic acidosis with increase of the urea concentration in the blood.

We have determined the deamination of *dl*-alanine, *dl*-valine, *dl*-leucine by measuring (6, 49) oxygen and amino acid consumption of kidney cell fragments and kidney slices of extreme thinness (0.05 mm.) in sodium chloride-bicarbonate-carbon dioxide and in sodium chloride-phosphate solutions with and without addition of amino acids. The oxygen consumption of the tissue slices not due to deamination of amino acids but to oxidation of keto acids formed in deamination etc., was inhibited by a preliminary one hour "shaking treatment" in the absence of oxygen at 38°C . The amino acid deaminase can stand this rough treatment; other oxidation ferments in kidney cells are more sensitive to it and perish after a short time. The oxygen tension was varied between 15 and 760 mm.Hg.

Below 60 mm.Hg oxygen, *i.e.*, just at those oxygen tensions actually occurring in the body under physiological and pathological conditions, we found the rate of deamination in surviving kidney cells very markedly dependent on variations of oxygen tension in phosphate solutions as well as in bicarbonate/ CO_2 . In intact tissue slices the rate of deamination of *dl*-alanine (0.05 M) was, at an oxygen tension of 41 mm.Hg, inhibited by 56 per cent compared to the deamination in air. The inhibition was completely reversible.

TABLE VII

Effect of oxygen tension of the oxidation of *dl*-alanine (M/20) in slices of kidney tissue. 37.8° C. Q_{O_2} = mm.³ oxygen consumed in 1 hour by 1 mg. (dry weight) of kidney tissue. (42)

| Volumes per cent of oxygen | Q_{O_2} Total oxygen consumption | | Q_{O_2} Oxygen consumed in oxidation of <i>dl</i> -alanine |
|-------------------------------|---------------------------------------|---|--|
| | I | II | II-I |
| | in NaCl phosphate without alanine | in NaCl phosphate <i>dl</i> -alanine | |
| 20 | 6.4 | 18.5 | 12.1 |
| 5.4 | 4.5 | 9.9 | 5.4 |
| 20 | 5.4 | 17.9 | 12.5 |

The curve of the rate of deamination of *dl*-alanine, *dl*-valine, *dl*-leucine in kidney cells—resembling the oxygen saturation curve of hemoglobin at 38°C. (63)—showed a steep drop at oxygen tensions below 60 mm.Hg, but only a negligible change between 60 and 760 mm.Hg. This explains why Krebs in his extensive work on amino acid metabolism (64) has overlooked the important role of oxygen tension for the rate of deamination. In his experiments on the influence of oxygen tension on the deamination of *dl*-alanine in kidney extracts (65), he varied the oxygen tension only above 160 mm.Hg; the maximal difference he could find between 160 and 760 mm.Hg was an increase in the rate of deamination of only 11 per cent. At an oxygen tension of 25.8 mm.Hg we found in suspensions of kidney cell fragments the rate of deamination of *dl*-alanine (0.05 M) inhibited by 49 per cent, at an oxygen tension of 18.2 mm.Hg, the rate of deamination of *dl*-valine (M/24) inhibited by 65 per cent as compared to

the rate of deamination in air. (Tables VII and VIII).

These experimental results seemed to provide an explanation for the phenomenon of reversible uremic acidosis in those states of kidney insufficiency in which the secretory renal functions are not impaired. They show that cessation of the chemical functions of the kidney is not necessarily due to anatomical destruction but can be caused by a temporary change in the gas concentration of the cell environment. Lowered oxygen tension in the kidney, no matter if caused by primary pathological processes in the kidney or by decompensated heart disease, hypertension, anemia, etc. reduces the renal amino acid deamination with corresponding ammonia formation to a fraction of the normal rate. The deamination of amino acids being the main source of urine ammonia (64), renal anoxia leads to disturbance of the acid-base equilibrium in the body; blood and tissue acids, reaching the kidney as sodium salts and

TABLE VIII

Effect of oxygen tension on the oxidation of *dl*-valine (M/20) in kidney cell residue. 37.8° C. Q_{O_2} = mm.³ oxygen consumed in 1 hour by 1 mg. (dry weight) of kidney cell residue (42).

| Volumes per cent oxygen | 20 | | 4 | | 2.4 | |
|--|---------------|--------------|----------------|--------------|--------------|--------------|
| | I — | II valine | III — | IV valine | V — | VI valine |
| Q_{O_2} Total oxygen consumption | 2.86 | 14.28 | 2.56 | 7.70 | 2.27 | 6.20 |
| Q_{O_2} Oxygen consumed in oxidation of <i>dl</i> -valine | II-I 11.42 | | IV-III 5.14 | | VI-V 3.93 | |

THE ROLE OF OXYGEN TENSION IN BIOLOGICAL OXIDATIONS

281

normally converted there into ammonium salts, are now, due to the inhibited ammonia production in the kidney, excreted as sodium salts into the urine; the blood bicarbonate drops and uremic acidosis ensues. But since this inhibition of deamination is a reversible reaction, the original rate of ammonia production is reestablished with the rise of the oxygen tension in the kidney to its original level, and the transient disturbance of the acid-base equilibrium disappears.

The finding of a reversible inhibition of deamination in the kidney by lowered oxygen tension may also offer an explanation of the mechanism of the reversible increase of blood urea found in cases of transient kidney insufficiency without secretory failure. Urea is the end product of deamination of amino acids in the liver, as is ammonia in the kidney. If the kidney is unable to carry out deamination, the portion of amino acids normally handled by the healthy kidney is offered to the liver and converted there into surplus urea; therefore the blood urea must rise, as a consequence of the reversible inhibition of the chemical functions of the kidney, even when its secretory functions are unimpaired and normal amounts of urea are excreted in the urine. Fig. 4 gives a schematic picture of the relation between the kidney and the liver with regard to the deamination of amino acids. It shows why a disturbance of the metabolism of the kidney cells must

lead to a drop of ammonia formation in the kidney and to rise of urea formation in the liver, and why, *vice versa*, a severe disturbance of the metabolism of the liver cells causes increased ammonia formation in the kidney, while the urea formation in the liver decreases (66, 67). If the disturbance of cell metabolism is of a reversible character, the pathological manifestations will disappear when normal conditions are reestablished. As soon as the kidney resumes its deaminizing activity, the vicarious plus-deamination in the liver ceases, and the urea formation is reduced to its original rate. States of transient uremia with acidosis as well as with high blood urea may thus be explained as being caused by the reversible inhibition of deamination of amino acids in the kidney cells under the conditions of lowered oxygen tension.

To the "fascinating simplicity of this conception," as he calls it, Meyer (68) raised the objection that though the experiments cited show that the rate of deamination of amino acids (ammonia formation) in kidney tissue decreased with decreasing oxygen tension, it was, however, very improbable that such conditions of low oxygen tension ever actually existed in the kidney. To support this experimentally, measurements of the oxygen tension of the urine of some patients were made, and since only slight differences were seen, the conclusion was drawn that *in vivo* the failure of the renal chemical function could not be explained as a result of lowered oxygen tension.

Schlayer showed, in reply to this objection (69), that it is impossible to set the oxygen tension of the urine on a par with the oxygen tension of the chemically active kidney tissue, since the oxygen tension of the urine is essentially determined by the oxygen tension of the extensive system of the collecting tubules and by that of the kidney pelvis, ureter, bladder and urethra, and moreover by Krogh's (70) "autooxidation" of the urine which, as Schlayer showed, changes considerably with the pH, being for instance 30 times higher in an alkaline than in an acid urine.

These discussions are quite instructive, because they indicate how the debate over the role of oxygen tension in biological oxidations has changed in the past years. Previously it was argued that cell respiration is entirely independent of oxygen tension and it makes no difference whether the oxygen tension in the cell milieu is high or low, for even at a minimal oxygen concentration the respiration remains at its maximal rate. Now, while the fact that the rate of cellular respiration is indeed markedly dependent on oxygen tension, is beginning to be accepted, the argument is raised from another angle by doubting the significance of this fact and contending that

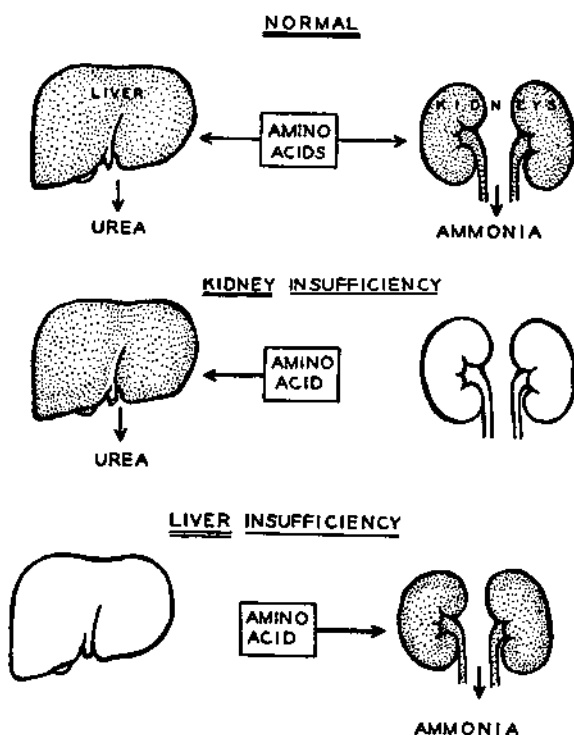


Figure 4.

such conditions of decreased oxygen tension never actually occur *in vivo*, although a series of exact measurements of oxygen tensions in the body have definitely shown the existence of "lows" in oxygen tension under various conditions (71-75).

I have chosen the instance of reversible uremia to point out the importance that must be attached to oxygen tension if one attempts to explain the mechanism of pathological conditions on the basis of biological laws. I do not want to go into other conclusions that could be drawn from this; perhaps at some future time we shall succeed in making therapeutic use of increased oxygen tension in the diseased tissue in such cases. Let me refer briefly to one other practical field where the same law of dependence of biological oxidations on oxygen tension suggests the application of just the reverse therapeutic measures: I mean the field of bacterial infection.

If, as our experiments have shown, bacterial respiration can be considerably suppressed by low oxygen tension, it could be anticipated that in bacteria which depend on respiration as their main source of energy, strangling this main source would bring about a state of minor chemical activity down to the point of "*vie latente*" (76) or "hibernation" (77). Indeed the growth of cultures of *Staphylococcus aureus* and of *Pneumococcus* that were examined in air and at lower oxygen tension under otherwise equal conditions, could be shown to be notably inhibited by decrease in oxygen tension (30, 38). But the reason why we fear the growth of bacteria in the body is, above all, that it increases the sum of their injurious effects, and while it is obvious that a smaller number of organisms will produce a smaller amount of metabolic products which in the case of pathogenic bacteria are harmful ("toxic") to the host, it follows from our experiments that also with an identical number of bacteria these "toxic" effects on the host will decrease with decreasing oxygen tension whenever the "toxic" substances are metabolic products formed in respiration. The effect of low oxygen tension on bacteria with mainly oxidative energy supply is thus seen to be a twofold one: a direct effect due to decrease of the chemical reactions, and, secondary to this, an indirect effect due to decrease of the bacterial growth. Both these effects of low oxygen tension are important for explaining the mechanism of numerous defense reactions of the body and may thereby be of value in deciding about the rationality or irrationality of a therapy to be applied. Formation of "closed off areas of inflammation" (75, 29, 77-81) and calcification may be the body's principle of producing low oxygen tension in a diseased organ in order to counteract injurious microorganisms. The same may be true for some forms of medical

treatment. Pulmonary tuberculosis offers an interesting example (43, 45). The respiration of tubercle bacilli is, as we saw (Fig. 1), highly dependent on variation of oxygen tension, and respiration is virtually the only source of energy for the bacillus. If, then, practical experience has shown the curative effect of artificial pneumothorax, thoracoplasty, phrenic paralysis and high altitude, we feel justified in substituting for explanations like resting or relaxation of the lung, purer air, etc., the quantitative finding of the decreased energy supply of the tubercle bacillus due to the factor common to all these forms of treatment: the lowering of the oxygen tension in the lung. A treatment with high oxygen tension, therefore, though likely to give symptomatic relief in some instances, is certainly not advisable from the standpoint of the biology of the tubercle bacillus. The same applies for the high oxygen treatment in pneumococcus pneumonia, since pneumococci also thrive much better in high than in low oxygen tensions (30).

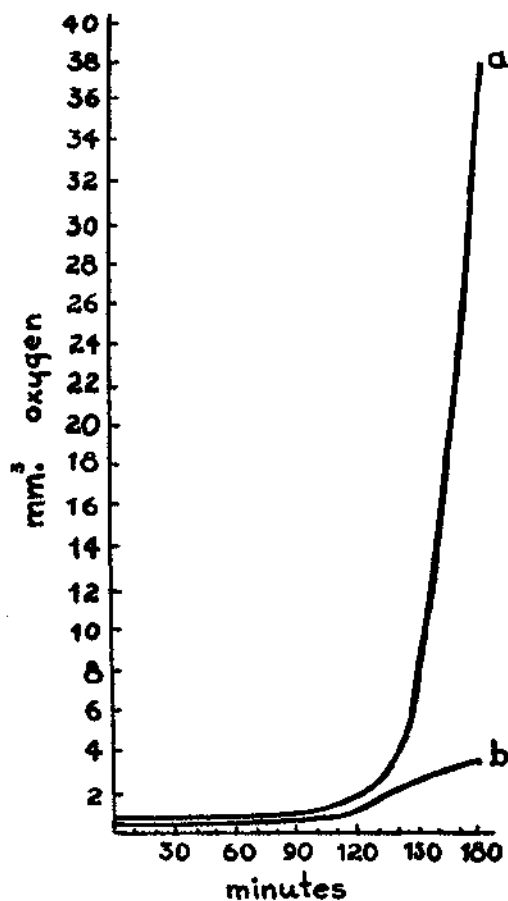


Fig. 5. Growth of pneumococci. Weight at beginning of experiment, 0.05 mg. (30). Curve a, 20 volumes per cent of oxygen. Curve b, 2 volumes per cent of oxygen.

THE ROLE OF OXYGEN TENSION IN BIOLOGICAL OXIDATIONS

283

But I do not want to enlarge any further here on practical applications and will briefly summarize the experimental results just reported.

1. We have to substitute for Warburg's all-or-nothing theory of respiration the law of the direct role of oxygen tension as a determining factor of the rate of respiration. This dependence of respiration on oxygen tension is found in cell-free plasma and in cells whose respiration is catalyzed by the iron-free yellow ferment as well as in cells whose respiration is catalyzed by the iron-containing phaeohaemin. It could be definitely proved that in these experiments on lowered oxygen tension, insufficient extra- and intracellular oxygen diffusion was not a limiting factor of respiration.

2. Together with the decrease of the rate of respiration there was also found in many cells a decrease of the respiratory quotient at lowered oxygen tension, revealing that the respiration was not only quantitatively but also qualitatively changed.

3. The sensitivity of respiration to oxygen tension is greatest in uninjured normal nucleated animal cells and young bacteria examined under physiological conditions, whereas old bacteria cultures, experimentally damaged mature leucocytes and non-nucleated red blood cells, even when their absolute rate of respiration was high, proved to be independent of variations of oxygen tension.

4. The oxygen affinity of the oxygen transferring ferment of cellular respiration is greatly influenced in many cells by the chemical composition of the suspension fluid, and in all cells by changes of temperature, just as is the affinity of oxygen to hemoglobin.

5. The Pasteur reaction, the disappearance or non-appearance of lactic acid formation in the presence of oxygen is not due to an effect of respiration on the lactic acid fermentation, but to a reaction of oxygen with the fermentation catalyst itself, no matter how the oxygen is transferred. There was no reciprocal relation between the oxygen affinity of the respiration ferment and that of the lactic acid fermentation ferment.

6. The effect of cyanide, carbon monoxide, ethyl cyanide, phenosafranin on cellular metabolism is explained as due to a direct reversible combination of these substances either with the catalytic system of lactic acid fermentation alone, or with catalysts of both systems, of that of respiration as well as that of lactic acid fermentation.

7. The lactic acid formation which mature leucocytes, injured tissue, and tumor cells show in air and in pure oxygen is explained as due not to their inhibited respiration, but rather to a direct irreversible change in their lactic acid fermentation ferment.

8. Just as cellular respiration, so oxidative deamination of amino acids in kidney tissue slices and kidney cell fragments is highly dependent on variations of oxygen tension.

9. The growth of bacteria whose main source of energy is respiration is diminished by lowered oxygen tension.

10. Decrease of oxygen tension in animal tissues might explain the incidence of pathological conditions, as that of reversible uremic acidosis, which one should attempt to counteract by high oxygen tension treatment. In contrast to this, diseases caused by bacteria whose main source of energy is respiration, should be treated by attempting to lower the oxygen tension in the affected organ.

REFERENCES

1. Kempner, W., *Klin. Wochenschr.*, **6**, 2386 (1927).
2. Warburg, O., and F. Kubowitz, *Bioch. Z.*, **214**, 107 (1929).
3. Warburg, O., *Z. physiol. Chem.*, **57**, 1 (1908).
4. Warburg, O., *Erg. d. Physiol.*, **14**, 264 (1914).
5. Oppenheimer, C., "Die Fermente", Vol. II, p. 1402 (Leipzig, 1925).
6. Warburg, O., "Stoffwechsel der Tumoren" (Berlin, 1926).
7. Warburg, O., "Ueber die katalytischen Wirkungen der lebendigen Substanz", (Berlin, 1928).
8. Meyerhof, O., "Chemische Voraenge im Muskel", (Berlin, 1930).
9. Dixon, M., "Manometric Methods", (Cambridge, 1934).
10. Meyerhof, O., *Pflügers Arch.*, **170**, 373 (1918).
11. Kempner, W., Unpublished experiments.
12. Warburg, O., and W. Christian, *Bioch. Z.*, **254**, 438 (1932).
13. Meyerhof, O., and D. Burk, *Z. physiol. Chem.*, **139**, 117 (1928).
14. Meyerhof, O., and W. Schulz, *Bioch. Z.*, **250**, 35 (1932).
15. Burk, D., *J. Physiol. Chem.*, **34**, 1174 (1930).
16. Iwasaki, K., *Bioch. Z.*, **226**, 32 (1930).
17. Warburg, O., and F. Kubowitz, *Bioch. Z.*, **214**, 4 (1929).
18. Tang, P. S., *Quart. Rev. Biol.*, **8**, 260, (1933).
19. Burk, D., *Oec. Publ. Am. Ass. Adv. Science*, No. 4, 121 (1937).
20. Lund, E. J., *Am. J. Physiol.*, **45**, 451 (1918).
21. Amberson, W. R., *Biol. Bull.*, **55**, 79 (1928).
22. Tang, P. S., *Biol. Bull.*, **60**, 242 (1931).
23. Tang, P. S., and R. W. Gerard, *J. Cell. and Comp. Physiol.*, **1**, 503 (1932).
24. Warburg, O., *Bioch. Z.*, **177**, 471 (1926).
25. Shoup, C. S., *J. Gen. Physiol.*, **13**, 27 (1929).
26. Gerard, R. W., and T. S. Falk, *Biol. Bull.*, **60**, 213 (1931).
27. Tang, P. S., and French, *Clin. J. Physiol.*, **7**, 353 (1933).
28. Gerard, R. W., *Biol. Bull.*, **60**, 245 (1931).
29. Lohmann, R., *Klin. Wochenschr.*, **10**, 1799 (1931).
30. Schlayer, C., *J. Bact.*, **31**, 181 (1936).
31. Bertho, A., and H. Glueck, *Ann. Chem.*, **494**, 159 (1932).
32. Warburg, O., F. Kubowitz, and W. Christian, *Bioch. Z.*, **242**, 170 (1931).
33. Leiner, G., *Bioch. Z.*, **276**, 186 (1935).
34. Bumm, E., H. Appel, and K. Fehrenbach, *Z. physiol. Chem.*, **223**, 207 (1934).

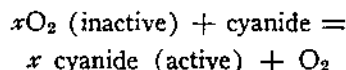
35. Laser, H., *Bioch. J.*, **31**, 1761 (1937).
36. Morawitz, P., *Arch. exp. Path. u. Pharm.*, **60**, 298 (1909).
37. Kempner, W., *Proc. Soc. Exp. Biol. and Med.*, **35**, 148 (1936).
38. Kempner, W., *J. Cell. and Comp. Physiol.*, **10**, 339 (1937).
39. Schlayer, C., *Bioch. Z.*, **293**, 94 (1937).
40. Kempner, W., *Am. J. Physiol.*, **123**, 117 (1938).
41. Kempner, W., *Klin. Wochenschr.*, **17**, 1 (1938).
42. Kempner, W., *J. Biol. Chem.*, **124**, 229 (1938).
43. Kempner, W., *Am. J. Physiol.*, **126**, 553 (1939).
44. Kempner, W., and M. Gaffron, *Am. J. Physiol.*, **126**, 554 (1939).
45. Kempner, W., *Am. Rev. Tub.*, **40**, 157 (1939).
46. Friedemann, T. E., M. Cotonio, and P. A. Shaffer, *J. Biol. Chem.*, **73**, 335 (1927).
47. Friedemann, T. E., and A. T. Kendall, *J. Biol. Chem.*, **82**, 23 (1929).
48. Friedemann, T. E., and Y. B. Graeser, *J. Biol. Chem.*, **100**, 291 (1933).
49. Schlayer, C., *Bioch. Z.*, **297**, 395 (1938).
50. Barcroft, J., and W. O. R. King, *J. Physiol.*, **39**, 374 (1909).
51. Dixon, H. and K. A. C. Elliot, *Bioch. J.*, **23**, 812 (1929).
52. Laser, H., *Nature*, **136**, 184 (1936).
53. Friedheim, E. A. H., *Bioch. J.*, **28**, 173 (1934).
54. Gaffron, H., *Fortschritte der Zoologie*, **1**, 267 (1937).
55. Lipmann, F., *Bioch. Z.*, **265**, 133 (1933).
56. Lipman, F., *Bioch. Z.*, **268**, 205 (1934).
57. Genevois, L., *Bioch. Z.*, **186**, 461 (1927).
58. Genevois, L., *Bioch. Z.*, **191**, 147 (1927).
59. Schlossmann, H., *Bioch. Z.*, **219**, 463 (1930).
60. Peschel, E., *Klin. Wochenschr.*, **9**, 1061 (1930).
61. Kempner, W., *J. Clin. Inv.*, **18**, 291 (1939).
62. Volhard, F., *Handb. d. Inn. Med.*, ed. by v. Bergmann and Staehelin, Vol. 6, Pt. I and II (Berlin 1931). (For references).
63. Barcroft, J., "The Respiratory Function of the Blood" (Cambridge 1914).
64. Krebs, A. H., *Z. physiol. Chem.*, **217**, 191 (1933).
65. Krebs, A. H., *Bioch. J.*, **29**, 1620 (1935).
66. Minkowski, *Experiment. Arch.*, **21**, 45 (1886).
67. Magnus-Levy, A., "Metabolism and Practical Medicine", ed. v. Noorden, Vol. 1, p. 104 (London, 1907).
68. Meyer, F., *Klin. Wochenschr.*, **17**, 1374 (1938).
69. Schlayer, C., *Klin. Wochenschr.*, **18**, 598 (1939).
70. Krogh, A., "The Respiratory Exchange in Animals and Men", p. 77 (London, 1916).
71. Campbell, J. A., and L. Hill, *J. Physiol.*, **58**, *Proc. Phys. Soc.* XXV (1924).
72. Campbell, J. A., *J. Physiol.*, **60**, 20 (1925).
73. Campbell, J. A., *J. Physiol.*, **62**, 211 (1927).
74. Campbell, J. A., *Physiol. Rev.*, **11**, 1, (1931). (Also for references).
75. Kempner, W., and E. Peschel, *Z. klin. Med.*, **114**, 439 (1930).
76. Bernard, Cl., "Lecons sur les phenomenes de la vie", Vol. I, p. 68 (Paris 1878).
77. Lohmann, R., *Klin. Wochenschr.*, **13**, 1112 (1934).
78. Bergmann, G. v., "Funktionelle Pathologie", p. 170 (Berlin 1932).
79. Loebel, R. O., E. Shorr and H. B. Richardson, *J. Bact.*, **26**, 139 (1932).
80. Lohmann, R., *Klin. Wochenschr.*, **17**, 427 (1938).
81. Lohmann, R., *Z. klin. Med.*, **135**, 316 (1938).
82. Kempner, W., *Biochem. Z.*, **257**, 41 (1933).
83. Kempner, W., and F. Kubowitz, *Biochem. Z.*, **265**, 245 (1933).
84. Kubowitz, F., *Biochem. Z.*, **274**, 285 (1934).

DISCUSSION

Dr. Stern: Kempner's experiments have brought out clearly the fact that it is the oxygen tension and not the respiration which is responsible for the Pasteur phenomenon. However, if I understood Kempner correctly, he has the concept that the Pasteur effect consists in the direct interaction of oxygen or hydrocyanic acid or carbon monoxide or any of the other agents cited with a component of the lactic acid fermentation system. Now if we remember that in the disturbance of the Pasteur effect lactic acid fermentation appears rather than disappears, then any combination of a component of the fermentation system itself with an inhibitor would, of course, tend to decrease rather than increase the fermentation.

I believe that Kempner's experiments can be interpreted as a de-inhibition of fermentation in the sense that carbon monoxide and hydrocyanic acid combine and thereby put out of action an agent which, under normal conditions, transfers oxygen to a component of the fermentation system thus decreasing the rate of breakdown of carbohydrate under aerobic conditions.

Dr. Kempner: The lactic acid fermentation system—let us call it x —reacts with O_2 . This combination xO_2 is inactive, or as we generally express it, oxygen inhibits the lactic acid fermentation. In the absence of oxygen the lactic acid fermentation ferment x is active. It is also active in the presence of cyanide/air. This might be explained by assuming that, in analogy to the action of cyanide on the respiration ferment system, cyanide combines likewise with the lactic acid fermentation ferment system, pushing the oxygen away and thus activating the ferment.



The essential result of the low oxygen tension and the cyanide experiments with regard to the Pasteur phenomenon is that the formation of lactic acid in the absence of oxygen or in the presence of cyanide is not the consequence of the decrease in respiration, but due to a direct effect of oxygen and of cyanide on the lactic acid fermentation system itself. O_2 affects x directly, regardless of how the oxygen is transferred to the fermentation system, whether by one of the catalysts which plays a role in respiration also or by some other oxygen carrier or "agent" in the cell.

Dr. Ball: I should like to ask Kempner if he does not think that in order to interpret his data in the way he has, he must not also make the assumption that under all the conditions which he has studied the energy requirements of the cell are not altered. Presumably the cell is utilizing

THE ROLE OF OXYGEN TENSION IN BIOLOGICAL OXIDATIONS

285

oxygen for the purpose of obtaining energy. What it does with that energy we know in part; how it does it we do not know. The cell carries on many functions and uses energy for many different purposes. Now, in the metabolism of a substrate we know that it may be broken down in stepwise fashion to CO_2 and H_2O and the energy in each step may perhaps be utilized differently. Therefore it seems to me possible that as the oxygen tension is lowered certain energy yielding reactions may stop before others do. Perhaps under such conditions oxygen would be utilized first for those reactions which are primarily essential for the cell. At any rate it seems a possibility that as the oxygen tension goes down, certain oxygen utilizing processes drop out, and that after you get down to a low oxygen tension where the cell cannot obtain enough energy through oxygen utilizing channels, you find the cell producing lactic acid and obtaining energy as in the anaerobic cycle.

I believe you indicated that only the oxidation of *d*-amino acids may be affected by lowered oxygen tension. I know of no evidence to indicate that *d*-amino acids are a normal constituent of the mammalian organism. The only evidence for the occurrence of a *d*-amino acid in living cells of which I know is that presented by Kögl and Erxleben for a *d*-glutamic acid in malignant tumors; I think we should therefore be a little careful in drawing too sweeping conclusions from experiments with this system.

Dr. Kempner: Before I go into the matter of the deamination of amino acids in kidney cells at low oxygen tensions, I will answer Ball's suggestion that under conditions of decreased oxygen tension, the cell stepwise discontinues the "less important" oxidation processes, only maintaining those oxidations which are of "primary importance" for cellular life, and that, if for these also the energy produced by oxidation becomes insufficient, the cell tries to obtain the necessary energy by the splitting of sugar to lactic acid. I am afraid that in this matter I am more pessimistic than Ball, for I do not think that if somebody has very little money at his disposal, he will spend that money only on essential things. So I am even more reluctant to agree entirely with the teleological interpretation that the cells by their "cleverness" should know what would be most reasonable for them to do under the conditions of lowered oxygen tension. The fact is that if the respiration rate is decreased to the same degree by different means, in one case—that of cyanide—lactic acid is formed, whereas in the other—that of low oxygen tension—lactic acid is not formed. That means that the two reactions, respiration and fermentation, are not coupled by the selective "cleverness" of cells trying to obtain their energy supply

one way or the other, but that these two reactions take place independently of each other, according to the different chemical constitution of the two ferments and the different reactivity of these with other substances, for instance with O_2 . Both lactic acid fermentation and respiration are dependent on oxygen tension, but the oxygen affinity of the oxygen transferring ferment of respiration is different from the oxygen affinity of the lactic acid fermentation ferment just as, for example, the carbon monoxide affinity of the respiration ferment is different from the carbon monoxide affinity of hemoglobin.

That the rate of respiration drops with decreasing oxygen tension can be experimentally proved; how the energy requirements of the cell are affected by decreasing oxygen tension, whether they are identical with those at a normal oxygen tension or whether they too are decreased, is a question I would not venture to decide.

I do not know of any means of measuring the energy required by red blood cells, for example. The methods we have enable us to measure only the amount of energy produced by the cells. My experiments have shown that the energy produced by the erythroblasts decreases with decreasing oxygen tension. The experiments on the inhibition of bacterial growth under conditions of lowered oxygen tension may be of some significance here: they indicate that the energy produced at low oxygen tensions is not sufficient to meet the energy requirements for growth.

Dr. Barron: Kempner has given evidence of what I tried to show two years ago at the Symposium on anoxia in Baltimore, where I pointed out that the influence of the oxygen tension on the orientation of reactions was of great importance; so much so that metabolism of some of the oxidizable substrates could be altered considerably. At that time I pointed out, for instance, that pyruvic acid in the presence of oxygen oxidized to acetic acid and CO_2 in streptococcus, while in the absence of oxygen it went into acetic acid and formic acid. There is here a clear example of the orientation of reaction of pyruvic acid due to the oxygen tension. Of course we might come to the conclusion that the degree of orientation of pyruvic acid metabolism from the formation of acetic acid and CO_2 and the formation of acetic acid and formic acid will depend on the oxygen tension. At that time I also put forward the opinion that this orientation of reactions could be applied to the so-called Pasteur phenomenon.

Now I was very much interested to see Kempner's data on the influence of oxygen tension in respiration, R.Q. and lactic acid formation. When he diminished the oxygen content to 6.1 per cent he found an inhibition of respiration of something

like 60 per cent with no lactic acid formation, but at the same time he found the R.Q. greatly diminished.

We have here one more example of the influence of the oxygen tension on the orientation of reactions. In this case you are working with cells where the orientation of reactions has changed on lowering the oxygen tension in a manner such that no decarboxylative oxidations are produced, but only the dehydrogenations.

As Kempner, I think, realizes, his experiments on amino acid oxidations and the effect of oxygen tension on the rate of these enzymic reactions, may not apply to living cells.

We know perfectly well that *d*-amino acids are oxidized by activation and oxidation by alloxazins is dependent to some degree on the oxygen tension. It is perfectly correct to assume that in such a case the rate of oxidation will depend on the oxygen tension, but the normal cell does not oxidize *d*-amino acids. The oxidation of natural amino acids seems to go through the cytochrome system, and in such a case, of course, the influence of oxygen tension will be different from the influence of oxygen tension in the oxidation of *d*-amino acids.

Dr. Kempner: Barron has emphasized the fact, resulting from the experiments with erythroblasts, that variation of the oxygen tension not only changes the oxidation processes quantitatively, but also qualitatively, as indicated by the fact that the respiratory quotient of erythroblasts decreases with decreasing oxygen tension. I welcome this statement as a confirmation of what I said at the end of my paper: that the discussion about the role of oxygen tension in biological oxidations has changed considerably in the last three years. Formerly one followed the Warburg all-or-nothing theory, saying that variation of the oxygen tension does not change biological oxidations at all, and even at last year's Symposium on anoxia (Baltimore, 1938) one of the principal speakers, R. W. Gerard, stated that oxygen tension has in no way to be considered as a controlling factor in biological oxidations. Now there is no longer any doubt that biological oxidations are affected by variations of oxygen tension, and the main interest is already concentrated upon finding out the mechanism and the chemical end products of cellular respiration under conditions of lowered oxygen tension.

As to the question of "orientation": That changes of orientation in cellular metabolism occur if one alters the gas milieu from pure oxygen or air to complete anaerobiosis, has been a well known fact since the time of Pasteur's experiments. The first and most important discovery of such a change in orientation was the finding that yeast cells in oxygen or air break down the

sugar to water and carbon dioxide, and in the absence of oxygen to alcohol; or that the end product of the sugar metabolism of animal cells in air and in oxygen is water and carbon dioxide, and in the absence of oxygen, lactic acid. That even in the complete absence of oxygen the metabolic process can be changed by variations of the gas milieu, was described by F. Kubowitz with whom I worked on the effect of carbon monoxide on butyric acid fermentation (82, 83, 84). In argon the butyric acid bacteria metabolize the sugar to butyric acid, in carbon monoxide the butyric acid fermentation is inhibited by 92 per cent, the sugar breakdown only by 28 per cent. The end product of the sugar breakdown that persists in carbon monoxide is no longer butyric acid, but lactic acid. Barron's observation that streptococci metabolize pyruvic acid differently in the presence and in the absence of oxygen, is another significant example of such a change in orientation of the metabolic process.

The new observation in the experiments with erythroblasts is that here the change in orientation is not produced by decreasing the available amount of oxygen to zero nor by the inhibition of certain metabolic processes by carbon monoxide, but that such a change in orientation occurs in spite of the presence of a sufficient amount of oxygen merely through variations of oxygen tensions beginning at 5 vol. per cent, *i.e.* at tensions as they frequently exist under physiological conditions in the animal body.

As to the question of deamination of amino acids in kidney cells, I have worked with kidney cell extracts as well as with normal kidney tissue slices. I have measured the oxygen and the amino acid consumption of these slices not only in salt solutions with and without additions of *dl*-mixtures of alanine, valine, and leucine, but also in physiological plasma and serum of man, rat, and rabbit. It could be shown in this way that under conditions of lowered oxygen tension, kidney cells are actually inhibited in their rate of deamination, not only of the unnatural *d*-amino acids, but also of those naturally present in serum or plasma or in the tissue slices themselves.

I think I must emphasize again in this connection that the effect of lowered oxygen tension on cellular respiration was not only found in cell-free plasma and cells the respiration of which is catalyzed by iron-free yellow ferments, but likewise in cells the respiration of which is connected with the cytochrome system and is catalyzed by the iron-containing phaeohaemin.

Dr. Shorr: There are two points upon which I should like to comment. The first bears on Ball's suggestion that there may be other changes in the metabolism of the cell under low oxygen tensions to account for the failure of lactic acid

THE ROLE OF OXYGEN TENSION IN BIOLOGICAL OXIDATIONS

287

to appear. It is quite conceivable that the rate at which the chemical reactions of the cells go on under these conditions may be slower than at the higher oxygen tensions. Should this take place, the Pasteur mechanism might still be operating to prevent the appearance of lactic acid. This question could be examined experimentally by direct heat measurements. I wonder whether Kempner has calculated the lactic acid oxidative quotient of the bacteria under optimum conditions. Should the excess respiration over fermentation be very high, respiration might fall very considerably without lactic acid appearing.

The second point is in reference to the refreshing direction which the study of the role of bacteria in infection is taking. I refer to the recognition that chemical factors may play an important part, as against the purely immunological point of view. This demonstration of the effect of lowered oxygen tensions on bacterial metabolism is evidence of this character. The example of the tubercle bacillus is particularly interesting to me because of some work on this same organism reported by Loebel, Richardson and myself in 1933. We soon became aware of the lack of an adequate anaerobic mechanism in these bacteria to provide energy for survival and growth. They were poorly resistant to relatively short periods of anaerobic exposure. They were, however, remarkably resistant to a wide variety of other adverse conditions, including caseous material, provided oxygen were supplied. We therefore looked into the possibility that the tubercle might function as a limiting factor in the spread of this disease, by actually suffocating the tubercle bacilli which it contains. We could determine the respiratory metabolism of the monocytes which make up the tubercle, and calculate that a tubercle with a diameter exceeding 0.5 mm. should have an anaerobic center, unfavorable both for cells and for the tubercle bacillus. Cell death should occur with caseation, and bacterial growth inhibited. This general conception seems to be borne out by observation on the tubercle in disease. The bacilli are always found close to the rim of viable cells and not in the center of the tubercle—in other words as close as possible to the oxygen supply. When a tubercle ruptures, the bacteria are found in that portion of the caseous matter closest to the bronchus. That the tubercle actually does function in part to wall-off bacteria and cut off their oxygen supply would seem very likely from this evidence. Studies of bacterial infections along these lines should prove productive.

Dr. Kempner: The "lactic acid oxidative quotient" under optimal conditions can easily be calculated for red and white blood cells. At low oxygen tensions their respiration rate may fall very considerably without appearance or increased

formation of lactic acid, independent of the magnitude of the quotient: rate of respiration in air to rate of anaerobic lactic acid formation.

Calculating Warburg's so-called "excess of fermentation" for myeloblasts by substituting in the equation $U = Q_M^{N_2} - 2Q_{O_2}$ the figures of Q_{O_2} in air and at 45 mm. Hg oxygen tension, given in Table VI, we find that U , negative in air, becomes positive with lowered oxygen tension:

$$U (\text{air}) = 11.5 - 2 \times 7.7 = -3.9$$

$$U (45 \text{ mm. Hg } O_2) = 11.5 - 2 \times 3.2 = +5.1$$

Dr. Shaffer: It has always been to me a very fascinating view to take with respect to the respiration of polycellular organisms that the metabolism is dependent upon the rate of oxygen access. Whether you call that rate of oxygen supply or diffusion or oxygen tension locally I don't quite know. If one can suppose that under ordinary circumstances the rate of metabolism is really limited by the rate of oxygen availability, then it becomes reasonably possible to distribute the metabolism between fat, carbohydrates, and the derivatives of protein. If, however, you are going to imagine some sort of condition of a reciprocal yet dependent character that will fluctuate in proportion to the demand or relative participation of fat or carbohydrates into the total energy exchange, you are endowing our cells with a sort of omniscience which Ball seems disposed to attribute to them.

I would like to protest against the idea of there being any definable energy "requirement" of cells. It reminds me of the question, "How much does it cost to live in New York?". The answer, if you will remember, is "More than you've got!" I believe that principle is just as applicable with respect to total metabolism of cells as it is to living in New York. We know perfectly well that, although there is an approximate rough uniformity of the basal metabolism of certain human groups, if you go to different parts of the world or choose different age groups, or permit activity, with any one subject there is no such thing as "a requirement" of the individual.

A word or two in regard to possible conceptions of the mechanism of the relationship between lactic acid production and oxygen consumption. I have long held a certain concept, without, however, being able to get convincing evidence of its correctness. But I will give it to you for what it is worth. Let us remember that in all cells there are present both substrate and catalysts capable, in the absence of sufficient respiration, of producing lactic acid. (I am leaving out of account the oxidative removal of lactic acid once formed and taking only one side of the picture.) The problem is, how does respiration or oxygen consumption

keep the catalyst from its substrate, the result of which action is to produce lactic acid? Does the following experiment illustrate a possible mechanism?

One takes a solution of urease and puts it into a long glass tube with a porous membrane at each end, and some distance beyond has two platinum electrodes; put a current across that will electrolyze the urease and deposit the enzyme on one membrane. Then add a solution of urea, while keeping the enzyme polarized on the membrane. When the urease is piled up deposited on the membrane, there is a certain minimum rate of ammonia production by the action of the enzyme on the urea solution. One may measure it at intervals. So long as there is imposed a certain small potential to maintain the polarization of the urease against the membrane, you maintain a constant small rate of ammonia formation. Now remove the trickle charger, or short circuit the cell; the urease redissolves in the buffer solution with an enormous acceleration of urease activity and rate of ammonia formation.

If one imagines that the cell contains some sort of a device which, as a result of oxygen consumption, polarizes the enzyme on the surface away from the substrate—and that is easily conceivable, I think, although the mechanics are difficult to picture—so long as you polarize the membrane by respiration you keep the substrate and enzyme separate. Stop it and immediately, by diffusion, enzyme and substrate come together. This sort of thing, it seems to me, is what we can look for to account for the inhibition of fermentation by respiration.

Dr. Ball: The point I tried to make and apparently failed to do is this. A cell can apparently obtain energy by an anaerobic cycle in which lactic acid appears as the end product or by an aerobic cycle wherein CO_2 is the end product. Since lactic acid formation does not increase proportionately with lowered oxygen consumption, as you have shown, it would therefore appear possible that the energy consumption of the cell per unit of time is also altered by the conditions imposed upon it. Therefore any interpretation as to why lactic acid formation occurs, it would seem, must also consider this factor. Certain energy-furnishing reactions which utilize oxygen may proceed more readily under lowered oxygen tension than others. Lactic acid formation may or may not occur, depending upon whether these reactions are capable of meeting the energy demands made by the cell per unit of time. Such a situation appears to occur in muscle where lactic acid accumulation may occur if the sudden demand for energy is greater than that which can be supplied by oxygen utilizing processes.

Dr. Shaffer: The polarization of the cell, keep-

ing the substrate away from the enzyme, might be accomplished at lower than the usual oxygen consumption. It is not necessary that the rate of lactic acid production begin immediately to increase as soon as the rate of oxygen consumption begins to decline.

Dr. Barron: When you work in 6 per cent oxygen you find a lowered respiration, and no influence on lactic acid formation. But you also have no CO_2 formation. Isn't that so?

Dr. Kempner: That is certainly true with the CO_2 formation of erythroblasts; in other cells, for instance in tubercle bacilli, the R.Q. remains constant.

Dr. Barron: Now in that case, if I say that the lactic acid formed at 6 per cent oxygen was oxidized to pyruvic acid, you will have the oxidation of lactic acid without CO_2 production. As Ball has pointed out, the influence of oxygen tension on the individual rates of oxidation may be different. If lactic acid oxidation to pyruvic acid goes through the cytochrome system, the influence of the oxygen tension on this oxidation will be less. As a consequence the small amount of lactic acid produced at 6 per cent will be oxidized to pyruvic acid. So I still maintain that you have lactic acid production at this oxygen tension, but this lactic acid might have been oxidized to pyruvic acid. I would say that lower oxygen tension acts differently on different enzymic reactions, and that the influence of oxygen tension on dehydrogenations is less than the influence of oxygen tension on oxidations in decarboxylative oxidations. Oxidations with no CO_2 formation are produced as a consequence; at a tension of 6.1 per cent you will have diminished oxygen production, but the rate of oxidation of lactic acid to pyruvic acid still persists. As a consequence you find no lactic acid, and as a consequence the CO_2 formation goes down; your diminished CO_2 formation may thus be explained.

Dr. Barker: It is known that carbohydrate oxidation can take place in intact tissues under the influence of iodoacetic acid, although the formation of lactic acid and of pyruvic acid is inhibited. If one assumes, on the basis of this evidence, that there is no dependence of respiration on a preliminary anaerobic phase, there is no apparent *a priori* reason for expecting either lactic or pyruvic acid as the oxygen tension is lowered.

Dr. Kempner: It was interesting to hear Barron's hypothesis about the mechanism of the metabolism change of erythroblasts at low oxygen tension. His assumption that the low respiratory quotient might be explained by their oxidizing some lactic acid, formed intermediately, to pyruvic acid is, however, experimentally disproved. For, considering the high respiratory rate of erythroblasts, even if only 40 per cent of this respiration remained, the pyruvic acid would be present in

THE ROLE OF OXYGEN TENSION IN BIOLOGICAL OXIDATIONS

289

large amounts and would easily show up in the manometrical experiment, where, as Warren has pointed out, every acid formation is detected by the carbon dioxide liberated from the bicarbonate of the suspension fluid.

Dr. Stern: In order to clarify our ideas about your concept about the Pasteur effect, would you put your scheme on the blackboard? I think we still disagree about this.

Dr. Kempner: I think any scheme on the mechanism of the Pasteur effect which one could put on the blackboard at present would be mere speculation unsupported by experimental facts. Warburg used to make a differentiation between two kinds of chemistry, experimental chemistry and so-called paper chemistry. Limiting ourselves to the former, all we can say up to now is that the Pasteur phenomenon, which means the disappearance of lactic acid in the presence of oxygen, is not due to a decreased rate of respiration, but to a direct action of the oxygen on a component of the lactic acid fermentation system.

Dr. Stern: Now in the old concept no separate Pasteur agent is assumed, but the effect of oxygen is pictured as an effect through respiration on fermentation.

Kempner believes that oxygen acts directly on a component of the fermentation system. His evi-

dence that respiration has nothing to do with the effect I consider as unequivocal and supported not only by Kempner's experiments but by several other workers in the field. The question resolves itself then: do we have to assume the existence of a separate Pasteur agent?

To my first remark Kempner replied that in his concept oxygen combines with a component x contained within the fermentation system, thereby producing a reversible inhibition of this component. Upon adding carbon monoxide or HCN the oxygen is displaced from the enzyme and glycolysis is permitted to occur. However, this simple concept meets with a great difficulty in that it implies that these substances which compete with the oxygen for this component in the fermentation system form a complex with this x which is catalytically active. Except for certain experiments on the effect of cyanide on the oxidation of unsaturated fatty acids by hematin there have been no cases reported where the combination of carbon monoxide or cyanide with a catalyst has preserved the catalytic activity. Therefore I feel that we have to assume the existence of a Pasteur agent which normally (*i.e.* in oxygen) inhibits a component of the glycolytic system. However, when it is poisoned by carbon monoxide or by cyanide the inhibition is removed and the activity of the glycolytic system restored.

***The Metabolism of Human Myeloblasts
and Its Sensitivity Toward Variations of Oxygen Tension***

THE METABOLISM OF HUMAN MYELOBLASTS AND ITS
SENSITIVITY TOWARD VARIATIONS OF OXYGEN
TENSION

BY

W. KEMPNER AND M. GAFFRON

Department of Medicine, Duke University, Durham, N. C.

PROCEEDINGS OF THE AMERICAN PHYSIOLOGICAL SOCIETY,
Toronto, Canada, 1939

REPRINTED FROM THE AMERICAN JOURNAL OF PHYSIOLOGY
Vol. 126, No. 3, pp. P553-554, July, 1939

PROCEEDINGS OF THE AMERICAN PHYSIOLOGICAL SOCIETY,
Toronto, Canada, 1939

Reprinted from THE AMERICAN JOURNAL OF PHYSIOLOGY
Vol. 126, No. 3, pp. P553-P554, July, 1939

The metabolism of human myeloblasts and its sensitivity toward variations of oxygen tension. W. KEMPNER and M. GAFFRON (introduced by G. S. Eadie). Department of Medicine, Duke University, Durham, N. C. (Read by title.)

The metabolism of the blood cells of a patient with myeloblastic leukemia was measured at oxygen tensions varying from 0 to 760 mm. Hg. The blood contained 180,000 leucocytes per c.mm., 95 per cent of which were myeloblasts. Blood samples were taken in heparin and immediately shaken in the thermostat in contact with gas mixtures containing 5 per cent carbon dioxide and varying proportions of oxygen and nitrogen. Oxygen consumption and aerobic and anaerobic glycolysis were determined manometrically by the Warburg methods.

Metabolism of 1 mgm. (dry weight) of myeloblasts per hour at various oxygen tensions
2.5·10⁻² M. NaHCO₃. 8.5·10⁻² M. glucose. 37.5°C.

| MM. Hg OXYGEN TENSION | C.MM. OXYGEN CONSUMED | C.MM. CARBON DIOXIDE FORMED | RESPIRATORY QUOTIENT | C.MM. LACTIC ACID FORMED | % INHIBITION OF RESPIRATION |
|-----------------------|-----------------------|-----------------------------|----------------------|--------------------------|-----------------------------|
| 760-160 | 7.7 | 5.8 | 0.75 | 0 | 0 |
| 60 | 4.0 | 0.95 | 0.24 | 0 | 48 |
| 45 | 3.22 | 0 | 0 | 0 | 58 |
| 0 | 0 | 0 | 0 | 11.5 | 100 |

Unlike more mature myelogenous cells and tumor cells with which they frequently are compared, myeloblasts show a purely oxidative metabolism under aerobic conditions. No lactic acid formation occurs unless the cells are submitted to almost complete absence of oxygen. Myeloblast respiration is very sensitive to variations of oxygen tension, showing marked inhibition at relatively high partial pressures of oxygen. Furthermore oxidation becomes very incomplete with lowered oxygen tension: the respiratory quotient decreases gradually to zero. The fact that in young white blood cells (myeloblasts) the marked drop of the respiration rate at low oxygen tensions does not lead to lactic acid formation makes it seem probable that the lactic acid formation which mature blood cells, injured tissue and tumor cells show in air and even in pure oxygen is not due to inhibited respiration but rather to a direct change in their lactic acid fermentation enzyme.

***The Nature of Leukemic Blood Cells
as Determined by Their Metabolism***

THE NATURE OF LEUKEMIC BLOOD CELLS AS DETERMINED BY
THEIR METABOLISM

By WALTER KEMPNER

Reprinted from THE JOURNAL OF CLINICAL INVESTIGATION, Vol. XVIII, No. 3, pp. 291-300,
May, 1939

Reprinted from THE JOURNAL OF CLINICAL INVESTIGATION, Vol. XVIII, No. 3, pp. 291-300, May, 1939.
Printed in U. S. A.

THE NATURE OF LEUKEMIC BLOOD CELLS AS DETERMINED BY THEIR METABOLISM

By WALTER KEMPNER

(From the Department of Medicine, Duke University School of Medicine, Durham)

(Received for publication December 5, 1938)

"The nature and etiology of leukemia are unknown" (1). Some authors (2, 3, 4, 5, 6, 7, 8) are in favor of classifying the leukemias as malignant neoplasms of the blood-forming organs, because of the formation of leukocytes in unaccustomed organs, the new growth of leukemic tissue, and the flooding of the blood stream with abnormal primitive cells. Others (9) prefer to consider leukemia as a type of benign tumor formation, or tissue metaplasia, or simply as an excessive, unregulated production and outpouring of essentially normal young tissue cells. To solve the problem by means of *morphological histology* has proved impossible (10).

A new approach to this question was opened, however, by the methods of *cellular physiology*, and this paper presents experimental results obtained by these methods, which, it seems to me, give an unambiguous and definite answer to the question of the nature of leukemic cells.

As Warburg (11) has found, cells of benign, and to an even greater degree of malignant tumors, differ fundamentally from normal cells in their energy supplying metabolic reactions. In all normal undamaged animal cells the magnitude of the oxidative metabolism is considerably greater than the magnitude of the glycolytic metabolism and, under aerobic conditions, no splitting of sugar into lactic acid (glycolysis) occurs. In the metabolism of benign tumor cells and even more of cancer cells, the respiration-glycolysis ratio is disturbed; the rate of glycolysis is high as compared to the rate of respiration and a great amount of lactic acid is formed under aerobic conditions. This aerobic glycolysis, however, may have a different origin; it can be produced, for example, by poisoning the cells with cyanide, carbon monoxide, or arsenious acid, by various injuries leading to the gradual death of the cell, or, in the more sensitive organs, simply by keeping the tissue in Ringer's solution instead of its own plasma. Aerobic glycolysis as such, then, is not specific for malignancy, but rather the fact that the cancer

cell can live and grow by its persisting glycolytic metabolism under aerobic and anaerobic conditions, whereas aerobic glycolysis in injured cells is only a metabolic phase of their dying off. *If, therefore, under physiological experimental conditions, the determination of the cell metabolism reveals aerobic glycolysis of zero, it is certain that the tissue examined is normal and not cancer tissue, whereas the positive finding of aerobic glycolysis need not be specific for cancer cells, but may characterize either cancer metabolism or the dying off of any tissue within or without the body.*

Since the results of experiments on the metabolism of white blood cells are scattered through the literature and there is no critical survey on the suitability or inadequateness of the methods employed, it seems advisable to give a bibliographical review on this subject.

Grafe (12) examined the blood of leukemic patients and showed that white blood cells have a high oxidative metabolism.

Levene and Meyer (13) were the first to show that leukocytes have a high glycolytic activity. This was confirmed by Bürger (14) for leukemic leukocytes.

Bakker (15) examined exudate leukocytes of rabbits, comparing their oxygen consumption and their glycolysis, and found a small rate of respiration together with *high aerobic glycolysis*. He concluded from these findings that white blood cells have *cancer metabolism*.

Fleischmann and Kubowitz (16) measured the metabolism of leukocytes from the blood of geese and from exudate of rabbits and found, like Bakker, in both instances *high aerobic glycolysis*. But since the aerobic glycolysis was higher in the white cells from exudate than in those from blood, they concluded that aerobic glycolysis in leukocytes is *not* a proof of *cancer metabolism*, but only a *symptom of injury*, as leukocytes will die off more rapidly in exudates than within the blood vessels.

Fujita (17) examined white blood cells and bone marrow of rats, Barron and Harrop (18) leukocytes from peritoneal exudates of rabbits, Jackson, Parker, and Glover (19) monocytes of rabbit's lung, Loebel, Shorr, and Richardson (23) monocytes of rabbit's peritoneum.

Common to all these experiments with mature animal leukocytes of various types, was the *ambiguous result that the fermentative metabolism was high in comparison to the oxidative metabolism and that splitting of sugar into lactic acid took place under aerobic conditions*. The original question remained unsolved, whether this me-

tabolism of leukocytes which all investigators agreed was different from the metabolism of normal cells, actually represented *cancer metabolism* or was *only due to injury or death of sensitive cells*.

Regarding the metabolism of human leukocytes, Kempner and Peschel (22) examined mononuclear and polynuclear cells obtained from sterile blisters of the skin. They found the absolute metabolism figures considerably higher than those reported for the various animal leukocytes, but the type of metabolism as such was identical with that of the exudate leukocytes of animals: high glycolysis, relatively low respiration, and also *lactic acid formation under aerobic conditions*.

Barron and Harrop (18) studied oxygen consumption and glycolysis in blood of patients with chronic leukemia and found *aerobic glycolysis present both in the blood of patients with lymphatic and with myeloid leukemia*. Unfortunately, the oxygen consumption was measured in the total absence of carbon dioxide (alkaline in the side bulb) and at a pH probably above 8 (pH determinations are not given); glycolysis was examined in N_2 instead of 5 per cent CO_2 /95 per cent N_2 . Furthermore, in the experiments with leukemic blood cells there are no figures given which indicate the amount of lactic acid formed by the cells but only the amount of sugar consumed, so that it is not possible to decide how much of the sugar consumed under aerobic conditions was used in respiration, how much for the formation of glycogen (30), and how much was actually split into lactic acid. On the basis of these sugar determinations the authors state that polynuclear leukocytes possess a higher aerobic and anaerobic glycolysis than mononuclear leukocytes and calculating Warburg's so-called "excess of fermentation" ($U = Q_M^{N_2} - 2QO_2$) they conclude that *the metabolism type of lymphatic leukemic blood cells resembles that of normal cells, whereas myeloid leukemic leukocytes show the metabolism type of cancer tissue*. They further state that *there is no difference in the metabolism of mature and immature granulocytes and of granulocytes from cases of leukocytosis or of myelogenous leukemia*. Since the metabolism figures given in their paper are calculated per million cells, not per weight, it is difficult to compare them with the results of other investigators. For the sake of completeness, however, we have included them in Table I, assuming—very inaccurately—that the dry weight of 10 million white blood cells is equal to 1 mgm.

Glover, Daland, and Schmitz (20) made an extensive study of the metabolism of normal and leukemic leukocytes, determining the oxygen and sugar consumption in the blood of patients with lymphatic and myelogenous leukemia. They too, like Barron and Harrop (18), measured the oxygen consumption in the presence of alkaline, eliminating the physiological carbon dioxide content, and not at a physiological pH, but between 7.6 and 8.2. For the determination of glycolysis they did not use any lactic acid determinations but only sugar determinations, so that in this paper also it cannot be gathered how much of the sugar consumption is due to sugar oxidation, to the formation of glycogen from sugar, or to the

splitting of sugar into lactic acid. Oxygen and sugar consumption were not determined in the same medium, the rate of glycolysis was calculated by deducting from the total sugar consumption the amount of sugar oxidized, assuming that all the oxygen consumed was used for the oxidation of sugar. In four cases of acute leukemia with for the most part *very primitive cells* (the authors say it has been impossible to determine exactly whether they were of lymphatic or myelogenous origin) they found the *aerobic glycolysis higher* than in cases of lymphatic and myelogenous leukemia with more mature cells, when using air to saturate the cell suspensions with oxygen. This, they state, was directly opposed to the results they obtained when the cell suspensions were exposed to 95 per cent oxygen. These conflicting results, however, are not due, as the authors think, to the difference between the effect of oxygen and that of air upon the cells. They only reveal the two other sources of error in the experiments under discussion. For, firstly, in the experiments in which the blood was saturated with air, the oxygen saturation (21 per cent) was evidently not sufficient to prevent the occurrence of completely anaerobic areas—especially since the blood was only submitted to "gentle agitation"—so that what was measured was not really the aerobic sugar consumption, but aerobic and anaerobic sugar consumption in undefined proportion; secondly, to the air used for saturation, no carbon dioxide was added, so that the experiment was done in the absence of carbon dioxide at an alkaline pH, whereas to the 95 per cent oxygen 5 per cent carbon dioxide was added, thus producing physiological conditions as to carbon dioxide concentration and pH. Determining the aerobic sugar consumption of the blood cells from five patients with myelogenous and five patients with lymphatic leukemia in this physiological milieu of 5 per cent CO_2 /95 per cent O_2 , Glover and his coworkers actually did find *aerobic glycolysis still present* in all of the five cases of myelogenous leukemia, but *it decreased with the immaturity of the cells*. Of the five cases of lymphatic leukemia, they found aerobic glycolysis present in three cases and absent in two, independent of the maturity or immaturity of the cells. Unfortunately, in this series of experiments, the only ones without fundamental errors in technique, only the sugar consumption and not the oxygen consumption was determined.

Schlossmann (21) and Peschel (1) examined blood cells from patients with lymphatic leukemia, determining oxygen consumption, aerobic and anaerobic lactic acid formation under physiological conditions manometrically with the Warburg technique. They were the first who were able to show that these immature lymphocytes—provided they are preserved from all injury and examined under physiological conditions—possess a purely oxidative metabolism and *no aerobic glycolysis* at all. From these findings Peschel concluded: Since mature and immature lymphocytes have a very different metabolism, in that the immature leukemic lymphocytes have a purely oxidative metabolism and do not show any formation of lactic acid under aerobic conditions, it is in the first place definitely proved that leukemic lymphocytes in regard

METABOLISM OF LEUKEMIC BLOOD CELLS

293

TABLE I

Summary of quantitative data on the metabolism of white blood cells (calculated for 1 mgm. of dry weight of cells per hour)

| Authors | Type of leukocytes | I Q_{O_2} Respiration (c.mm. oxygen consumed in air) | II Q_{O_2} Q_M Aerobic glycolysis (c.mm.* lactic acid formed in air) | III Q_{N_2} Q_M Anaerobic glycolysis (c.mm.* lactic acid formed in absence of oxygen) | IV Inhibition of lactic acid formation by air | V Ratio of aerobic gly- colysis to respiration $\frac{II}{I}$ | |
|---|--------------------------------------|--|--|--|---|--|------|
| Bakker 1927 (15) | Exudate leukocytes of rabbits | 0.4 | 5.7 | 6.0 | <i>per cent</i> 5 | 14.3 | |
| Fleischmann and Kubowitz 1927 (16) | Exudate leukocytes of rabbits | 4.5 | 14.0 | 23.3 | 40 | 3.10 | |
| | Blood leukocytes of geese | 4.9 | 1.8 | 11.6 | 85 | 0.37 | |
| Fujita 1928 (17) | Bone marrow cells of rats | 9.8 | 3.7 | 21.0 | 82 | 0.38 | |
| | Blood leukocytes of rats | 9.2 | 2.6 | 20.2 | 87 | 0.28 | |
| Jackson, Parker, and Glover 1930 (19) | Monocytes of rabbits lungs | 5.6 | 1.4† | 2.7† | 48 | 0.25 | |
| Loebel, Schorr, and Richardson 1932 (23) | Monocytes of rabbits peri- toneum | 2.8 | 3.0 | 4.9 | 39 | 1.07 | |
| Barron and Harrop 1929 (18) | Chronic myelogenous leukemia | 8.0 | 9.0† | | | 1.12 | |
| | Chronic lymphatic leukemia | 4.9 | 2.0† | | | 0.41 | |
| Glover, Daland, and Schmitz 1930 (20) | Myelogenous leukemia | Immature | 2.4 | 11.2† 2.8† | 17.8† | 84 | 4.66 |
| | | Mature | 2.6 | 8.0† 17.8† | 16.0† | 0 | 3.08 |
| | Lymphatic leukemia | Immature | 2.4 | 11.2† 1.5† | 15.9† | 91 | 4.66 |
| | | Mature | 5.8 | 5.2† 2.2† | 17.2† | 87 | 0.90 |
| | Normal human blood leukocytes | 7.1 | 8.8† 13.8† | 13.8† | 0 | 1.24 | |
| Schlossmann 1930 (21) | Leukemic lymphocytes | 12.0 | 0 | 21.9 | 100 | 0 | |
| Peschel 1930 (1) | Leukemic lymphocytes | 5.8 | 0 | 11.1 | 100 | 0 | |
| Kempner and Peschel 1930 (22) | Human exudate leukocytes | 22.8 | 16.8 | 57.8 | 71 | 0.74 | |
| Bossa (1937) (29) | Myelogenous leukemia | Chronic state | 10.2 | 14.9 | 29.8 | 50 | 1.46 |
| | | Acute state | 12.2 | 17.8 | 23.1 | 23 | 1.46 |
| | Chronic lymphatic leukemia | 13.3 | 0.9 | 17.8 | 95 | 0.07 | |

* 1 c.mm. = 0.004 mgm. of lactic acid.

† Lactic acid formation not determined manometrically nor chemically but assumed to be equal to sugar consumption.

to their metabolism are *not tumor cells* but normal young tissue cells. Secondly, the concept of a transition from normal lymphocytes to tumor cells *via* leukemic degenerated cells is excluded; thirdly, the *aerobic glycolysis of mature lymphocytes is only a manifestation of their dying off in the blood stream or exudate*. The signifi-

cance of Peschel's findings has been repeatedly discussed and emphasized, for instance in great detail in W. Fleischmann's review (24, see also 25) and by von Bergmann (26).

Soffer and Wintrobe (27) examined oxygen and sugar consumption in the blood of patients with mye-

logenous and lymphatic leukemia. The proportion of myeloblasts in the leukocytes specimen examined varied between 4 and 33 per cent. Soffer and Wintrobe used the same methods as Barron and Harrop (18) and came to the same conclusions: that the metabolism of the blood of myeloid leukemia resembles that of cancer, while that of lymphatic leukemia is more similar to that of normal tissue. The additional contributions of this paper are quantitative data which show that the unphysiological conditions of the method applied for examining the blood cells (absence of carbon dioxide, undefined pH, insufficient bicarbonate and sugar concentrations) injure the cells to such an extent that, as the authors state, a considerable and persistent decrease of the rate of respiration sets in at the very beginning of their experiment, so that after the first half hour, for example, the rate of respiration has dropped to only one-third of that measured in the first ten minutes. The second result of this work, *viz.*, that the degree of this decrease of the respiration rate depends on the number of cells per volume of suspension fluid, indicates still better the detrimental effect of the unphysiological conditions enumerated above; for it is obvious that the rate of all changes in the composition of the suspension medium (sugar-, bicarbonate concentration, pH) will increase directly with the increase of the number of metabolizing cells present.

Horsters published a paper on comparative investigations on glycolysis of myeloid and lymphatic leukocytes (28). His procedure was to fill blood citrate suspensions into closed test tubes and allow them to stand for 1 to 2 hours at room temperature; then in the leukocytes layer, diluted ten times with saline solution, sugar consumption was measured in 10-minute periods and lactic acid formation in 180-minute periods. The carbon dioxide concentration was zero, the weight of the blood cells was not given. The blood was saturated with air in a standing cylinder every ten minutes, but not shaken in the intervals, so that it cannot be told for what proportion of time the cells were under aerobic and anaerobic conditions respectively. The conclusions of this paper: that suspensions of leukocytes of the myeloid type consume sugar relatively quickly in an atmosphere of air (38° C.) and form equivalent amounts of lactic acid, and that sugar consumption and lactic acid formation of suspensions of lymphocytes are relatively small, are similar to the statements of Barron and Harrop (18), Glover, Daland, and Schmitz (20), and Soffer and Wintrobe (27), although Horsters omitted mentioning these authors as well as the experiments of Peschel (1) and the review of Fleischmann (24).

The most recent study of the metabolism of leukemic cells was made by Bossa (29). He obtained leukocytes by brief centrifuging and suspended them in the serum of normal people. Oxygen consumption, aerobic and anaerobic glycolysis were determined by the Warburg methods. In the total number of white blood cells the differential proportion of myeloblasts varied from 1 to 40 per cent, that of lymphoblasts from 10 to 70 per cent. Bossa arrived at the same results as previous investi-

gators: in all cases of myelogenous leukemia, whether of the acute or chronic type, he found a high aerobic glycolysis ($Q_M^{O_2}$: 4.2 to 37.3). The average ratio of aerobic glycolysis: respiration in his cases of chronic myelogenous leukemia was exactly the same as in his cases of acute myelogenous leukemia: 1.4. In leukemic lymphocytes he found the aerobic glycolysis either very small or zero. In spite of the high aerobic glycolysis of myelogenous cells, Bossa does not consider their metabolism as signifying cancer metabolism but merely as a symptom, as Peschel had done, of cell injury within or outside the body and therefore nothing but a transitional metabolic phase before the ultimate death of the cells.

The study of leukemic lymph nodes yielded the same ambiguous result (positive aerobic glycolysis) as that of leukemic blood cells. Victor and Potter (31) and Victor and Wintersteiner (32) examined the metabolism of lymph nodes of normal mice and of mice inoculated with different lines of transmissible lymphogenous leukemia, controlling age and genetic constitution. In all cases regardless of age, line, transfer number, and host conditions, they found aerobic glycolysis, which was usually even greater in the leukemic than in the normal lymph nodes. From the presence of aerobic glycolysis in all the lymph nodes, both leukemic and normal, the authors concluded that it was impossible to differentiate infections from neoplasms using cellular metabolism as a criterion.

Table I gives a summary of the quantitative data from the above mentioned experiments on the metabolism of normal and leukemic white blood cells. It must, however, be emphasized again that only part of these results were obtained by satisfactory methods and under physiological conditions. It is evident from the table that the aerobic glycolysis-respiration ratio in granulocytes is always positive. Calculated from the given figures (Column V) it varies in mature blood and exudate leukocytes between 0.25 and 3.1 (Bakker's figure, 14.3, excluded), in leukemic granulocytes between 1.1 and 4.7; in leukemic blood lymphocytes examined under physiological conditions it is zero. That means all "normal," *i.e.*, mature human and animal blood and exudate leukocytes, as well as the more immature granulocytes from all the patients with myelogenous leukemia, showed a lactic acid formation under aerobic conditions; the absolute values varied from 1.4 to 17.8 c.mm. of lactic acid formed by 1 mgm. of leukocytes in 1 hour; whereas in the immature leukemic lymphocytes, aerobic lactic acid formation did not occur.

EXPERIMENTAL

In a large series of experiments on 40 cases of myelogenous and 15 cases of lymphatic leukemia, I have found, in complete agreement with other authors (1, 21) that leukemic lymphocytes do not show any aerobic lactic acid formation, that is, that they exhibit the type of metabolism characteristic of undamaged normal young cells.

The experimental approach to the question of

the nature of leukemic granulocytes proved to be complicated and difficult, since in most cases of myelogenous leukemia accurate measuring of the actual metabolism of the immature cells exclusively is not possible. For, if there is a large proportion of myeloblasts and the total white blood count is small, the metabolism of the myeloblasts is obscured by the respiration and splitting metabolism of the red blood cells. If, on the contrary, the white blood count is high and the proportion of myeloblasts small, the metabolism of the myeloblasts is obscured by the respiration and splitting metabolism of the mature granulocytes. The problem resolves itself into the obtaining of uninjured immature granulocytes without an admixture of mature white blood cells and of erythrocytes. The actual separation of the mature and immature white blood cells in amounts sufficient for metabolism determination is impossible. Calculation of the metabolism figures of the immature cells by merely subtracting metabolism figures of the mature cells, according to their proportion in the differential cell count, is likewise impossible because of the great variability of the metabolism figures of the mature cells, as shown in Table I. Moreover, the differential cell count is irrelevant since only the differential cell weight here is essential. The separation of red and white blood cells seems easy at first glance, but it is just this apparent ease which is the main source of error in experiments with these sensitive cells, which above all must remain uninjured in order to survive in a normal condition. Even simple procedures, such as centrifuging or sedimenting the blood by allowing it to be stationary for any length of time, or exposure to low temperatures, are sufficient to injure the cells considerably, so that it may well occur that it is not the difference in metabolism of the various types of leukocytes that is measured, but only the difference in their resistance to various injuries.

Since, therefore, a material of uninjured immature granulocytes without admixture of mature granulocytes and red blood cells obviously cannot be obtained by experimental means, investigations of the metabolism of leukemic immature cells would be impossible but for the rare opportunity of meeting with a case of leukemia in which the leukocyte count is high in comparison to the red blood cell count, and the proportion of myelo-

blastic cells to mature white cells is so great that the metabolism of both red and mature white blood cells does not enter into consideration. Such cases occur with extreme rarity, and even among cases of myeloblastic leukemia cited in the literature, with a white blood cell count above 100,000, a differential count of more than 70 to 80 per cent of myeloblasts is not often mentioned. The presence of only 20 to 30 per cent of mature white cells, however, may suffice to prevent the exact determination of the metabolism of the myeloblasts themselves. In nine years of studying the metabolism of blood cells, I have encountered only a single case presenting the conditions required. This patient had a white cell count of 180,000 with about 95 per cent of immature myeloblastic cells.

In preparing the blood specimen for the metabolism experiment, great care was taken to avoid all injury to the cells. Blood was taken from the cubital vein in heparin (1 mgm. per 2 c.cm. of blood) and very gently shaken with glass beads in a cylinder for 3 minutes. The blood should not be taken in oxalate or citrate solution, it should not be diluted, and it should be saturated at body temperature with 5 per cent carbon dioxide in air as soon as possible. When the number of leukocytes per c.cm. of blood is very great, it may happen that within a short time after the removal of the blood from the body so much bicarbonate and sugar has been used up by aerobic glycolysis and respiration, that the aerobic glycolysis to be measured is reduced to a fraction of its optimal rate, or may even disappear. A purely oxidative metabolism may thus be simulated, which is, however, only due to low concentrations of bicarbonate or glucose, or to a more acid pH (33). In such instances the sugar and bicarbonate content of the blood, as well as its anaerobic glycolysis, must be determined in a preliminary experiment, and, if necessary, enough glucose and sodium bicarbonate added to make sure that during the whole time of the experiment the metabolism is measured under physiological conditions, *i.e.*, sugar concentration 1.2 grams per liter, bicarbonate concentration 560 c.mm. per c.cm., pH 7.4.

The proportion of white and red blood cells was determined by direct hematocrit reading and checked by comparison with the total cell volume

and number of red blood cells, assuming that a concentration of five million red blood cells of normal size per c.mm. corresponds to a cell volume of 45 per cent. The dry weight of the total cell volume was determined according to Peschel (1).

The metabolism determinations were done manometrically. The method, frequently applied (18, 19, 20, 27), of determining aerobic lactic acid formation by measuring the sugar consumption is inadequate, since the measured decrease of the sugar concentration does not indicate how much of the sugar has been used in respiration or in the formation of glycogen (30), and how much has been actually split into lactic acid.

The blood was pipetted into three rectangular manometer vessels, each of about 18 cc. capacity, and into one conical vessel with a large insert well. The side bulbs of all four vessels contained 6 and 3×0.03 c.cm. M/17 lactic acid, previously weighed in. The main space of Vessel I contained 6 c.cm. of blood, that of Vessels II and III 3 c.cm. of blood, that of Vessel IV 0.2 c.cm. of M/3 sodium bicarbonate, and the insert well of Vessel IV 2 c.cm. of blood. The vessels were saturated, while being shaken in the thermostat at 38° C., with gas mixtures prepared over mercury in a gasometer of 2-liter capacity: Vessels I, II, and IV with 5 per cent CO₂/95 per cent air, Vessel III with 5 per cent CO₂/45 per cent CO/50 per cent N₂. The shaking speed employed was 180 oscillations per minute. Readings were made every five minutes without stopping the manometers. The figures remained constant for over one hour. After this time, or in other experiments after 20 minutes, the lactic acid was tipped in from the side bulbs. The retention of carbon dioxide and of lactic acid

by the blood cells, as well as the metabolism figures for oxygen consumption, carbon dioxide formation, and lactic acid formation were calculated according to Warburg (34).

Table II shows the blood metabolism of the patient with myeloblastic leukemia and of a normal woman of the same age. Calculated per mgm. of dry weight of cells, the anaerobic lactic acid formation of the myeloblastic blood is 7.6 times greater, the respiration 47 times greater than that of normal blood. The absolute metabolism figures of respiration and anaerobic glycolysis are not important as compared with the finding that no lactic acid is formed by the myeloblastic blood in air, and that the aerobic glycolysis-respiration ratio, in the blood of the patient with myeloblastic leukemia, is 0 to 235 against 45 to 5 in normal blood.

From a comparison of the metabolism figures of myeloblastic blood to those of normal blood one can obtain the metabolism figures of the myeloblasts themselves, as shown in Table III.

The absolute value of the rate of respiration is of the same magnitude as that of immature leukemic lymphocytes and of human erythroblasts, 154 times greater than that of mature erythrocytes, but only one-third of that of human exudate leukocytes. The respiratory quotient of myeloblasts in air is 0.75. The rate of anaerobic glycolysis of leukemic granulocytes and leukemic lymphocytes is nearly the same: 11.5 and 11.1 c.mm. of lactic acid is formed in one hour by 1 mgm. (dry weight) of cells, against 58 c.mm. formed by human exudate leukocytes, 51 c.mm. formed by human nucleated red blood cells, and 0.5 c.mm. formed by mature erythrocytes (Table IV). An amount of lactic acid equal to the cell

TABLE II

Metabolism of myeloblastic and of normal blood (calculated per 100 mgm. of total blood cell dry weight and per 1 hour)

| | I Respiration (c.mm. oxygen consumed in air) | II Aerobic glycolysis (c.mm.* lactic acid formed in air) | III Anaerobic gly- colysis (c.mm.* lactic acid formed in absence of oxygen) | IV Inhibition of lactic acid formation by air | V Ratio of aerobic glycolysis to respiration $\frac{II}{I}$ |
|---|--|---|--|--|---|
| | | | | <i>per cent</i> | |
| Blood of patient with myeloblastic leukemia | 235 | 0 | 380 | 100 | 0 |
| Blood of normal woman | 5 | 45 | 50 | 10 | 9 |

* 1 c.mm. = 0.004 mgm. of lactic acid.

METABOLISM OF LEUKEMIC BLOOD CELLS

297

TABLE III

Calculation of metabolism figures for 1 mgm. (dry weight) of myeloblasts

| | I c.mm. oxygen consumed in air in 1 hour | II c.mm.* lactic acid formed in air in 1 hour | III c.mm.* lactic acid formed in absence of oxygen in 1 hour | IV Inhibition of lactic acid formation by air per cent | V Aerobic lactic acid formation to respiration $\frac{II}{I}$ |
|--|---|--|---|---|---|
| 100 mgm. of blood cells of patient with myeloblastic leukemia (30 per cent white blood cells, 70 per cent red blood cells) | 235.0 | 0 | 380 | 100 | 0 |
| Minus 70 mgm. of blood cells of normal person (70 per cent of the cells of the myeloblastic blood) | 3.5 | 31.5 | 35 | 10 | 9 |
| 30 mgm. of myeloblasts (30 per cent of the cells of myeloblastic blood) | 231.5 | 0 | 345 | 100 | 0 |
| 1 mgm. of myeloblasts | 7.7 | 0 | 11.5 | 100 | 0 |

* 1 c.mm. = 0.004 mgm. of lactic acid.

TABLE IV

Metabolism of human blood cells (calculated per 1 mgm. of dry weight of cells per hour)

| Cell species | I Q_{O_2} Respiration (c.mm. oxygen consumed in air) | II Q_{O_2} Aerobic glycolysis (c.mm. lactic acid formed in air) | III Q_{CO_2} Anaerobic gly- colysis (c.mm. lactic acid formed in absence of oxygen) | IV Inhibition of lactic acid formation by air per cent | V $\frac{II}{I}$ Aerobic lactic acid formation to respiration |
|-----------------------------|---|---|---|---|---|
| Erythroblasts (35) | 12.80 | 24.30 | 50.6 | 52 | 1.92 |
| Erythrocytes | 0.05 | 0.45 | 0.5 | 10 | 9.00 |
| Exudate leukocytes (22, 35) | 22.80 | 16.80 | 57.8 | 71 | 0.74 |
| Leukemic lymphocytes (1) | 5.80 | 0 | 11.1 | 100 | 0 |
| Myeloblasts | 7.70 | 0 | 11.5 | 100 | 0 |

dry weight is formed under anaerobic conditions by myeloblasts in 22 hours, by erythroblasts in 5 hours, by erythrocytes in 500 hours, by exudate leukocytes in a little over 4 hours. Under aerobic conditions the same amount of lactic acid is formed by erythroblasts in 10 hours, by exudate leukocytes in 15 hours, by erythrocytes in 550 hours. Lymphoblasts and myeloblasts form no lactic acid aerobically.

The metabolic features of the maturity process of red blood cells are well seen in the metabolism figures of human erythroblasts and erythrocytes (35). The rate of respiration, as well as that of lactic acid fermentation is considerably lower in the older than in the younger cells. But since the rate of respiration has decreased much more than the rate of fermentation (250 times against 50

times) a disturbance of the aerobic glycolysis-respiration ratio results. This ratio in mature erythrocytes is 9, in erythroblasts 2. Table V contrasts the white blood cell metabolism in the case of pure myeloblastosis with that in cases of myelogenous leukemia with a smaller proportion of immature cells. In Case I the proportion of the more mature cells (segmented, juvenile and myelocytic granulocytes, and lymphocytes) to the myeloblasts is 98:2, in Case II 50:50, in Case III 5:95. The aerobic glycolysis-respiration ratio is, in Case I 7.2, in Case II 1, in Case III 0.

As demonstrated for red blood cells, in white blood cells also the increase of the aerobic glycolysis-respiration ratio is evidence only of the increasing age or the maturity of the cells. The figures of Table V, especially of Column V, show

TABLE V

Blood metabolism of three cases of myelogenous leukemia with different proportions of myeloblasts to more mature granulocytes

| | Total white blood cell number per c.mm. | Lymphocytes | Segmented, stab and juvenile forms | Myelocytes | Myeloblasts | Proportion of more mature granulocytes to myeloblasts | I \dot{Q}_{O_2} Respiration | II $\dot{Q}_{O_2}^M$ Aerobic glycolysis | III $\dot{Q}_{CO_2}^M$ Anaerobic glycolysis | IV Inhibition of glycolysis by air per cent | V Ratio of aerobic glycolysis to respiration $\frac{II}{I}$ |
|-----|---|-------------|------------------------------------|------------|-------------|---|-------------------------------------|---|---|---|---|
| I | 186,000 | 2 | 67 | 29 | 2 | 98 : 2 | 2.8 | 20.2 | 24.6 | 18 | 7.2 |
| II | 52,000 | 3 | 18 | 29 | 50 | 50 : 50 | 2.4 | 2.4 | 5.3 | 55 | 1.0 |
| III | 179,000 | 2 | 1 | 2 | 95 | 5 : 95 | 7.7 | 0 | 11.5 | 100 | 0 |

quantitatively why former investigators (18, 20, 27) ascribed the properties of cancer-cell metabolism to leukemic myelogenous cells. All the instances of myelogenous leukemia appearing in the literature, where metabolism determinations were made, belong to the same group as Cases I and II of our Table V, *i.e.*, the leukocytes examined were not young immature leukemic granulocytes but mixtures of "old" mature and "young" immature cells in which these old and dying cells predominated to so great an extent that the characteristic metabolism of the myeloblasts as such was entirely obscured.

The question, therefore, of the nature of the leukemic myeloblastic cell is definitely answered, it seems to me, by the results on the energy supplying reactions of the myeloblastic cells. The metabolism of myeloblasts is purely oxidative, there is no aerobic splitting of sugar into lactic acid which is invariably found in benign and, to a greater degree, in malignant tumor cells, in injured cells, mature leukocytes, and erythrocytes. Even the aerobic glycolysis of the erythrocytes, which constitute 70 per cent of the cell volume of the blood examined is, in the manometrical experiment, completely overshadowed by the high myeloblastic respiration. Myeloblasts, contrary to the mature blood and exudate leukocytes of healthy and leukemic people, possess the characteristic metabolism of uninjured normal young cells. From the standpoint of cellular physiology one may say definitely that the metabolism of myeloblasts differs fundamentally from that of malignant tumor cells.

In previous experiments (22) we examined the chemical composition of tissue fluids in normal and inflamed areas and found a disturbed equilibrium

of oxygen, carbon dioxide, sugar, lactate, and bicarbonate as a result of inflammation. The products of the metabolism of exudate leukocytes which accumulated in the closed manometer vessel, also accumulated in very high amounts in the inflamed area, and were not carried off by the blood or lymph flow. After an inflammation period of three days, the sugar concentration of sterile blisters of the skin, for instance, was zero against 100 mgm. per cent in normal tissue fluid; the sodium lactate concentration was above 125 mgm. per cent against 10 mgm. per cent; the bicarbonate had decreased to half its amount and the pH had dropped to values as low as 6.2. We stated then, as our opinion, that these chemical changes, due for the most part to the aerobic glycolysis of the leukocytes, play an important rôle in the fight of the body against bacteria, since under these unfavorable conditions of the nutrient medium bacteria are severely damaged, or even starved to death. This opinion was supported by von Bergmann (26) and Lohmann (33, 36).

Since, in contrast to the mature white blood cells, the myeloblastic cells lack completely aerobic glycolysis, they are unable to produce any of the above mentioned chemical effects. The function of the mature leukocytes, therefore, can not be taken over by the more immature leukemic cells, and it is obvious why an increase of immature leukocytes with a decrease of mature forms leads to serious danger whenever pathogenic bacteria attack the body. The detrimental factor is not the presence of myeloblasts, or lymphoblasts, but the absence of mature white cells capable of forming lactic acid under aerobic conditions.

For the vague concept of "weakened resistance" of patients with myeloblastic or lymphoblastic

leukemia toward bacterial infection, we may substitute a definite quantitatively measurable chemical fact, namely, that the purely oxidative metabolism and total lack of aerobic glycolysis of the myeloblasts and lymphoblasts renders them unable to carry out the bactericidal "reactions of inflammation."

CONCLUSIONS

1. Whether leukemic cells are malignant or benign tumor cells, or normal young tissue cells, can not be decided by morphological investigation. The question can be answered definitely by studies of the metabolic reactions of leukemic blood cells.

2. The metabolism of the blood cells from 15 patients with lymphatic leukemia and from 40 patients with myelogenous leukemia was determined manometrically with the Warburg method. Myeloblasts as well as lymphoblasts—in contrast to the more mature forms of leukocytes—have a purely oxidative metabolism and do not form lactic acid under aerobic conditions. The aerobic glycolysis-respiration ratio in the blood of a patient with myeloblastic leukemia (180,000 white cells per c.mm., 95 per cent myeloblasts) was 0 to 235, against 45 to 5 in normal blood. The anaerobic glycolysis of the myeloblastic blood was 7.6 times, the respiration 47 times greater than that of normal blood. The respiratory quotient of myeloblasts, measured in air, was 0.75. Aerobic glycolysis which occurs (independent of the rate of respiration) in more mature leukocytes was found to be a symptom of their ageing and dying off. Myeloblasts as well as lymphoblasts exhibit the characteristic metabolism of uninjured normal young cells, and not that of cancer cells.

3. The weakened resistance of patients with myeloblastic or lymphoblastic leukemia toward bacterial infection is explained by the absence of aerobic glycolysis in immature leukemic blood cells.

BIBLIOGRAPHY

1. Peschel, E., Stoffwechsel leukaemischer Lymphocyten. *Klin. Wchnschr.*, 1930, 2, 1061.
2. Virchow, R., Die krankhaften Geschwuelste. Bd. II, Hirschwald, Berlin, 1864, p. 568.
3. Banti, G., Die Leukaemien. *Centralbl. f. allg. Path. u. path. Anat.*, 1904, 15, 1.
4. Ribbert, H., Menschliche Zellen als Parasiten. *Deutsche med. Wchnschr.*, 1907, 33, 329.
5. MacCallum, W. G., A Textbook of Pathology. W. B. Saunders Co., Philadelphia, 1936, 6th ed., p. 875.
6. Boyd, W., The Pathology of Internal Diseases. Lea and Febiger, Philadelphia, 1935, 2d ed., p. 618.
7. Ewing, J., Neoplastic Diseases. W. B. Saunders Co., Philadelphia, 1928, 3d ed., p. 397.
8. Richter, M. N., and MacDowell, E. C., Experiments with mammalian leukemia. *Physiol. Rev.*, 1935, 15, 509.
9. Sternberg, C., Blutkrankheiten, Leukaemien. In: Henke-Lubarsch, *Handb. d. spez. Path. Anat. u. Hist.*, 1926, 1, 56.
10. Naegeli, O., Blutkrankheiten und Blutdiagnostik. Springer, Berlin, 1931, 5th ed.
11. Warburg, O., Stoffwechsel der Tumoren. Springer, Berlin, 1926.
12. Grafe, E., Die Steigerung des Stoffwechsels bei chronischer Leukaemie und ihre Ursachen. *Deutsches Arch. f. klin. Med.*, 1911, 102, 406.
13. Levene, P. A., and Meyer, G. M., On the action of leukocytes on glucose. *J. Biol. Chem.*, 1912, 12, 265.
14. Bürger, M., Untersuchungen über Hämoglykolyse. *Ztschr. f. d. ges. exper. Med.*, 1923, 31, 1.
15. Bakker, A., Einige Uebereinstimmungen im Stoffwechsel der Carcinomzellen und Exsudatleukocyten. *Klin. Wchnschr.*, 1927, 6, 252.
16. Fleischmann, W., and Kubowitz, F., Ueber den Stoffwechsel der Leukocyten. *Biochem. Ztschr.*, 1927, 181, 395.
17. Fujita, A., Ueber den Stoffwechsel der Koerperzellen. *Biochem. Ztschr.*, 1928, 197, 175.
18. Barron, E. S. G., and Harrop, G. A., Jr., Studies on blood cell metabolism. *Metabolism of leukocytes. J. Biol. Chem.*, 1929, 84, 89.
19. Jackson, H., Parker, F., and Glover, E. C., Studies of diseases of the lymphoid and myeloid tissues. I. *J. Exper. Med.*, 1930, 52, 547.
20. Glover, E. C., Daland, G. A., and Schmitz, H. L., The metabolism of normal and leukemic leukocytes. *Arch. Int. Med.*, 1930, 46, 46.
21. Schlossmann, H., Ueber den Stoffwechsel von Lymphocyten. *Biochem. Ztschr.*, 1930, 219, 463.
22. Kempner, W., and Peschel, E., Stoffwechsel der Entzuendung. *Ztschr. f. klin. Med.*, 1930, 114, 439.
23. Loebel, R. O., Shorr, E., and Richardson, H. B., The influence of adverse conditions upon the respiratory metabolism and growth of human tubercle bacilli. *J. Bact.*, 1933, 26, 167.
24. Fleischmann, W., Pathologische Physiologie des Stoffwechsels weisser Blutzellen. *Wien. med. Wchnschr.*, 1933, 83, 215.
25. Fleischmann, W., Der Stoffwechsel des geschaedigten Gewebes. *Naturwissenschaften*, 1936, 24, 15.
26. von Bergmann, G., Funktionelle Pathologie. Springer, Berlin, 1932, p. 170.
27. Soffer, L. J., and Wintrobe, M. M., The metabolism of leukocytes from normal and leukemic blood. *J. Clin. Invest.*, 1932, 11, 661.

28. Horsters, H., Vergleichende Versuche ueber die Glykolyse durch myeloische und lymphatische Leukocytenformen des menschlichen Blutes. *Ztschr. f. d. ges. exper. Med.*, 1936, **97**, 479.
29. Bossa, G., Sul metabolisma dei leucociti leucemici. *Haematologica*, 1937, **18**, 673.
30. Willstätter, R., and Rohdewald, M., Ueber Aufbau und Abbau des Glykogens durch Leukocyten. (Zehnte Abhandlung ueber Enzyme der Leukocyten.) *Ztschr. f. physiol. Chem.*, 1937, **247**, 115.
31. Victor, J., and Potter, J. S., Studies in mouse leukemia. XI. Metabolic effects of host constitution. *J. Exper. Med.*, 1934, **60**, 547.
 Studies in mouse leukemia: Pre-leukemic changes in lymphoid metabolism. *Brit. J. Exper. Path.*, 1935, **16**, 234.
 Studies in mouse leukemia: Metabolic observations in spontaneous lymphatic leukemia. *Brit. J. Exper. Path.*, 1935, **16**, 253.
32. Victor, J., and Wintersteiner, M. B., Studies in mouse leukemia. X. Metabolic differences between transmission lines of mouse lymphatic leukemia. *Am. J. Cancer*, 1934, **22**, 561.
33. Lohmann, R., Zellstoffwechsel und Entzuendung. *Klin. Wchnschr.*, 1938, **17**, 427.
 Biologie der Entzuendung. *Ztschr. f. klin. Med.*, 1938, **135**, 316.
34. Warburg, O., Kubowitz, F., and Christian, W., Ueber die Wirkungen von Phenylhydrazin und Phenylhydroxylamin auf den Stoffwechsel von roten Blutzellen. *Biochem. Ztschr.*, 1931, **242**, 170.
35. Kempner, W., Metabolism of human erythroblasts. *J. Clin. Invest.*, 1936, **15**, 679.
36. Lohmann, R., Krebsstoffwechsel und Entzuendung. *Klin. Wchnschr.*, 1931, **10**, 1799.
 Manometrische Untersuchungen ueber Stoffwechsel und Wachstum von Bakterien unter dem Einfluss von ultraviolettem Licht und unter den Bedingungen der Entzuendung. *Klin. Wchnschr.*, 1934, **13**, 1112.

Sauerstoffzehrung des Urins und Sauerstoffdruck der Niere
[Oxygen Consumption in Urine and
Oxygen Tension in the Kidney]

Oxygen Consumption in Urine and Oxygen Tension in the Kidney by Clotilde Schlayer

As Kempner found, both the formation of ammonia and the deamination of amino acids in surviving kidney tissue is reversibly inhibited by a reduction in oxygen pressure. Based on these findings, Kempner explains reversible uremic acidosis, a condition caused by a reversible failure of the chemical processes of the kidney in various pathological conditions in which oxygen pressure in the kidney falls below the critical level.

Measuring the oxygen pressure of urine directly upon its discharge into the renal pelvis provides no direct measurement for oxygen pressure in those parts of the kidney where deamination and ammonia formation take place, because the oxygen pressure of urine is also significantly affected by the oxygen pressure of the extensive connecting system of renal tubules.

I measured the oxygen consumption of urine in healthy and diseased persons (excluding patients with disease of the efferent urinary tract) manometrically at body temperature and at physiological oxygen pressure. The experiments showed great variation in the speed of the oxygen consumption, in experimental subjects and also in the same subject, where differences seemed to depend on time of day, amount of urine, fluid intake, and type of diet.

In sum, the magnitude of oxygen pressure in urine is dependent on a number of opposing and parallel factors, especially the rate of urine oxygen consumption. The rate of urine oxygen consumption depends on the concentration of readily oxidizable substances and on the presence of oxidation catalysts and anti-catalysts, and varies considerably with the pH. Oxygen pressure in urine is thus not a measure for oxygen pressure in the kidney.

SAUERSTOFFZEHRUNG DES URINS
UND
SAUERSTOFFDRUCK DER NIERE

VON

C. SCHLAYER

AUS DER MEDIZINISCHEN KLINIK DER DUKE UNIVERSITÄT
DURHAM, N. C., U.S.A.
(DIREKTOR: PROF. DR. F. M. HANES)

SONDERDRUCK
AUS KLINISCHE WOCHENSCHRIFT
1939, NR. 17, SEITE 598/599

VERLAGSBUCHHANDLUNG JULIUS SPRINGER IN BERLIN

SONDERDRUCK AUS

KLINISCHE WOCHENSCHRIFT

ORGAN DER GESELLSCHAFT DEUTSCHER NATURFORSCHER UND ÄRZTE
VERLAG VON JULIUS SPRINGER, BERLIN, UND J. F. BERGMANN, MÜNCHEN

JAHRG. 18

29. APRIL 1939

Nr. 17, S. 598/599

SAUERSTOFFZEHRUNG DES URINS UND SAUERSTOFFDRUCK DER NIERE.

Von

C. SCHLAYER.

Aus der Medizinischen Klinik der Duke Universität, Durham, N. C., U.S.A.
(Direktor: Prof. Dr. F. M. HANES).

Wie KEMPNER¹ gefunden hat, wird die Ammoniakbildung bzw. die Desaminierung von Aminosäuren im überlebenden Nierengewebe durch Verminderung des Sauerstoffdruckes reversibel gehemmt. KEMPNER erklärt auf Grund dieser Befunde die reversible urämische Acidose bedingt durch ein reversibles Versagen der chemischen Leistungen der Niere bei den verschiedenartigsten pathologischen Zuständen, bei denen der Sauerstoffdruck in der Niere unter das kritische Niveau sinkt.

F. MEYER² hat gegen die „bestechende Einfachheit dieser Konzeption“ den Einwand erhoben, daß die Versuche KEMPNERS zwar gezeigt hätten, daß im überlebenden Nierengewebe die Geschwindigkeit der Ammoniakbildung bzw. der Desaminierung mit sinkendem Sauerstoffdruck abnähme, daß es aber sehr unwahrscheinlich sei, daß in der Niere tatsächlich jemals solche Zustände von vermindertem Sauerstoffdruck beständen. Als experimentellen Beweis dafür gibt F. MEYER Messungen des Sauerstoffdruckes im Harn von einem Gesunden und 4 Nierenkranken und findet, daß die Unterschiede der von ihm festgestellten Werte (Mittel des maximalen Sauerstoffdruckes im Harn der Nierenkranken: 45 mm Hg, 5,9 Vol.-%, im Harn des Gesunden: 54 mm Hg, 7,1 Vol.-%) zu gering seien, um in vivo die chemische Dysfunktion der Niere als Folge verminderten Sauerstoffdruckes zu erklären.

Die Aufgabe, die F. MEYER sich gestellt hat, die Messung des aktuellen Sauerstoffdruckes im Nierengewebe von Gesunden und Nierenkranken, wäre selbstverständlich von großer theoretischer und klinischer Bedeutung. Doch gilt wohl immer noch CAMPBELLS Bemerkung am Schluß eines Vortrags über CO₂- und O₂-Druck in der Blase: „The factors controlling oxygen tensions in the urine require further elucidation“³, und es ist jedenfalls unmöglich, wie F. MEYER es getan hat, den Sauerstoffdruck des Harns bedenkenlos dem

— 2 —

Sauerstoffdruck des chemisch arbeitenden Nierengewebes gleichzusetzen.

Denn erstens: Angenommen, der Urin konnte direkt beim Austritt in das Nierenbecken untersucht werden, so ist doch der Sauerstoffdruck dieses Urins wesentlich durch den Sauerstoffdruck des ausgedehnten Sammelrohrsystems der Harnkanälchen mitbestimmt, ergibt also keinen direkten Maßstab für den Sauerstoffdruck der Nierenteile, in denen die chemische Arbeit der Desaminierung bzw. Ammoniakbildung geleistet wird.

Zweitens: Wenn, wie es meistens geschieht und wie F. MEYER es getan hat, der Urin erst beim Austritt aus der Harnröhre untersucht wird, so wird der Harnsauerstoffdruck durch den jeweiligen Sauerstoffdruck von Nierenbecken, Harnleiter, Blase, Urethra und durch die Geschwindigkeit, mit der der Weg vom Nierenbecken bis zur Urethra zurückgelegt wird, wesentlich und nicht gleichmäßig mitbestimmt, besonders wenn, wie bei Nierenkranke, Ausscheidungsgeschwindigkeiten und Menge des Urins verändert sind.

Drittens findet, ganz abgesehen von eventuellem cellulären Sauerstoffverbrauch, im Urin selbst eine Sauerstoffzehrung statt (KROGH⁴, „Autoxydation des Urins“), die, wie die vorliegende Arbeit zeigen wird, imstande ist, unter bestimmten Bedingungen die gesamte, im Urin enthaltene Sauerstoffmenge innerhalb weniger Minuten zum Verschwinden zu bringen.

F. MEYER hat keinen dieser Faktoren berücksichtigt, zum Teil beeinflusst durch SARRE⁵, der auf Grund von Sauerstoffbestimmungen im Urin von Nierengesunden erklärt, die Sauerstoffzehrung im Urin sei minimal und käme als Fehlerquelle nicht in Betracht.

Ich habe die Sauerstoffzehrung des Urins von Gesunden und Kranken (unter Ausschluß von Krankheiten der ableitenden Harnwege) manometrisch⁶ bei Körpertemperatur und physiologischen Sauerstoffdrücken gemessen. Frischgelassener Urin wurde kurz zentrifugiert, filtriert und je 2 ccm davon in einen Warburg-Kegel gegeben. Der Kegelanhalt enthielt KOH.

Die Versuche ergaben große Schwankungen der Geschwindigkeit der Sauerstoffzehrung bei verschiedenen Versuchspersonen und auch bei der gleichen Versuchsperson in scheinbarer Abhängigkeit von Tageszeiten, Urinmenge, Flüssigkeitsaufnahme und Art der Diät. Bei Sättigung und Belastung mit C-Vitamin war die Geschwindigkeit der Sauerstoffzehrung vermehrt. Besonders auffallend war, daß kurz nach den Hauptmahlzeiten, bei vorwiegender Pflanzenkost, sowie bei Patienten, die an starkem Erbrechen gelitten hatten, die Geschwindigkeit der Sauerstoffzehrung wiederholt eine beträchtliche Steigerung zeigte.

Als gemeinsame Ursache für diese Befunde ergeben sich hauptsächlich 3 Faktoren, die bestimmend auf die Geschwindigkeit der Sauerstoffzehrung wirken:

1. Die Konzentration der im Urin vorhandenen, bei Körpertemperatur leicht oxydablen Substanzen (z. B. Ascorbin-

— 3 —

säure, Cystein, Fructose, Urobilinogen), deren Art und Menge durch pathologische Zustände und verschiedene Diäten verändert wird.

2. Die Konzentration von oxydations-katalytisch und -antikatalytisch wirksamen Substanzen (Eisen, Kupfer, Phosphate⁷, Ammoniak, CO_2)⁸.

3. Das für die im Urin stattfindenden verschiedenen Oxydationsvorgänge jeweils optimale p_{H} .

Die Abb. 1 zeigt den Sauerstoffverbrauch von 1 ccm Vormittagsurin (spez. Gew. 1018) einer normalen Versuchsperson bei einem Anfangssauerstoffdruck von 4,5 Vol.-% und $37,5^\circ$. Kurve I gibt die Sauerstoffzehrung des Urins bei p_{H} 5,8, Kurve 2 bei p_{H} 8,2. Die Geschwindigkeit der Sauerstoffzehrung innerhalb der ersten Stunde ist in diesem Urin bei alkalischer Reaktion 32 mal so groß wie die im saueren Milieu.

Im alkalischen Milieu beträgt der Sauerstoffverbrauch von 1 ccm Urin ($37,5^\circ$, 4,5 Vol.-% O_2) innerhalb der ersten Stunde 32 cmm; d. h. bei Berücksichtigung des O_2 -Absorptionskoeffizienten müßte innerhalb von 2 Minuten die gesamte Sauerstoffmenge, die der Urin bei dieser Temperatur und diesem O_2 -Druck aufnehmen kann, bereits verbraucht worden sein, wenn nicht von Nierenbecken, Blase usw. immer wieder neuer Sauerstoff zuströmen würde.

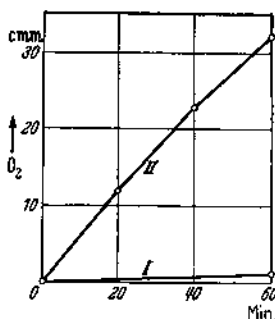


Abb. 1. Sauerstoffverbrauch von 1 ccm Urin einer normalen Versuchsperson.

$37,5^\circ$, 4,5 Vol.-% O_2
I: p_{H} 5,8; II: p_{H} 8,2.

Der Sauerstoffdruck im Urin ist also wesentlich bestimmt einerseits durch die Größe des Sauerstoffzustroms von den ableitenden Harnwegen in den Urin, andererseits durch die Geschwindigkeit der im Urin selbst stattfindenden Sauerstoffzehrung.

Zusammenfassung: Die Größe des Sauerstoffdrucks im Urin ist von einer Vielzahl von neben- und gegeneinander wirkenden Faktoren abhängig, unter denen die Geschwindigkeit der Urin-Sauerstoffzehrung eine wesentliche Rolle spielt.

Die Geschwindigkeit der Urin-Sauerstoffzehrung hängt von der Konzentration leicht oxydabler Substanzen und der Gegenwart von Oxydations-Katalysatoren und -Antikatalysatoren ab und variiert beträchtlich mit dem p_{H} . Der Sauerstoffdruck des Urins ist also kein Maßstab für den Sauerstoffdruck in der Niere.

Bei Messungen der Konzentration von reduzierenden Substanzen im Urin (z. B. bei C-Vitaminbestimmungen) ist die Geschwindigkeit, mit der diese Substanzen innerhalb und außerhalb des Körpers in saurem oder alkalischem Milieu verbraucht werden, als beträchtliche Fehlerquelle zu berücksichtigen.

— 4 —

Literatur: ¹ KEMPNER, Klin. Wschr. 1938, 971. — MEYER, Klin. Wschr. 1938, 1374. — ² CAMPBELL, J. of Physiol. 65 — Proc. phys. Soc. 18 (1928). — ³ KROGH, The respiratory exchange in animals and men, p. 77. London 1916. — ⁴ SARRE, Pflügers Arch. 239, 377 (1938). — ⁵ WARBURG, Stoffwechsel der Tumoren. Berlin 1926. — ⁶ WARBURG, Katalytische Wirkungen. Berlin 1928. — ⁷ STEIGERWALDT, Biochem. Z. 298, 197 (1938).

***The Effect of Various Sulfonamide Drugs on Pneumococcus,
as Determined by Measuring Manometrically the Bacterial Metabolism***

**The Effect of Various Sulfonamide Drugs on
Pneumococcus, as Determined by Measuring
Manometrically the Bacterial Metabolism**

BY

FREDERIC M. HANES

AND (By Invitation)

WALTER KEMPNER

DURHAM, N. C.

**FIFTY-SIXTH ANNUAL MEETING
OF
THE ASSOCIATION OF AMERICAN PHYSICIANS
Atlantic City, N. J.
MAY 6 AND 7, 1941**

*From the
Transactions of the Association of American Physicians
1941, vol. lvi, p. 152*

Reprinted from the Transactions of the Association of American Physicians, 1941,
vol. lvi, p. 152

THE EFFECT OF VARIOUS SULFONAMIDE DRUGS ON
PNEUMOCOCCUS, AS DETERMINED BY MEAS-
URING MANOMETRICALLY THE
BACTERIAL METABOLISM

By FREDERIC M. HANES

AND (By Invitation)

WALTER KEMPNER

DURHAM, N. C.

(From the Department of Medicine, Duke University School of Medicine.)

THE rapidity with which remedies belonging to the sulfanilamide group are being introduced to clinical and preventive medicine, has made it desirable to establish accurate *in vitro* methods for the evaluation of the bacteriostatic and bacteriocidal potency of these drugs. Before claiming superiority for any special drug, one must study its toxicity, and the rate of its absorption and excretion by the body. But it is essential to examine the direct reaction between the various drugs and the different types of bacteria under various conditions, and to do this quantitatively, the standard bacteriological methods of culturing and counting bacteria have several obvious disadvantages. Constant conditions of O₂ and CO₂ concentration, pH and so on, cannot be maintained during the course of the experiment. Observation of growth after transfer of the drug-affected culture to fresh drug-free optimal media, tells nothing about the condition of the bacteria during the period of exposure to the drug. The bacteriological methods of culturing and counting cannot be applied without interrupting the actual experiment. Each time that data are required concerning the effects of the drug on the bacteria, the original culture tube must be opened, or a separate control culture tube must be used for determining each single point of the growth curve.

It is true that the inaccuracy inherent in variations of the inoculum can be minimized by the use of the phototransfectometer, by means of which the initial number of bacteria used for primary inoculation of the culture tubes can be accurately determined, and

subsequent comparative determinations of the number of bacteria can be made. By this method, however, no information is obtained as to the actual state of the bacteria, for the density of the cultures may be the same, whether the bacteria are living or dead. Furthermore, the accuracy of evaluating the drug effect by means of the photronreflectometer is greatly impaired in bacterial cultures in which lysis occurs easily.

| Hour | Million cells per cc. |
|------|--------------------------|
| 19 | 1725 |
| 27½ | 820 |
| 50½ | 275 |

FIG. 1.—Photronreflectometer readings showing decrease in density of a full-grown beef infusion-dextrose broth culture, pH 7.8, of pneumococcus (Type I) gently shaken in thermostat at 38° C for nineteen, twenty-seven and one-half and fifty and one-half hours in air.

Figure 1 illustrates this difficulty. A full-grown pneumococcus broth culture is gently shaken in the thermostat at 38° C. for nineteen, twenty-seven and fifty hours and the density of the culture is determined with the photronreflectometer. The decrease in density, *i. e.*, the lysis, is obvious and simply a function of time. Thus in pneumococcus cultures one might encounter the queer phenomenon of finding an identical photronreflectometer reading in a culture with and without sulfonamides, incubated for eight hours, for example, but it would be wrong to conclude from such a finding that the sulfonamide was ineffective. For the drug-free culture may have reached its maximal growth after only four hours, and its density may have been steadily decreasing from that time on, because of the lysis, while the drug-containing culture began to grow only after seven hours, and had not even reached its highest peak at the time of the reading.

The measurement of the chemical reactions of bacteria by the manometric technic of Warburg¹ is the most exact and sensitive method available for measuring increases and decreases in bacterial activity. This technic is based on the circumstance that it is easy to measure minute differences in the pressure or volume of *gases*, whereas it is impossible, or at least extremely laborious, to determine such differences in most *solid substances*. The cell physiological methods simply make use of the fact that most of the vital chemical reactions of cells are primary gas reactions and that in some of the cellular reactions, which as such are not primary gas reactions, one can arrange the composition of the medium in such a way that the non-gaseous reactions of the cell cause a gas reaction in the medium.

EFFECT OF SULFONAMIDE DRUGS ON PNEUMOCOCCUS 3

Such manometric determinations can be carried out for many days with the original culture in the same vessel, and since readings can easily be made every five or ten minutes, the reaction of the bacteria with a drug is continuously observable and quantitative data are available for every growth period. Constant conditions of O_2 and CO_2 concentration, pH and so on, are maintained throughout the experiment and there is no variation of the bacterial density in the different layers of the cultures. Furthermore, the actual reactions of the bacteria are measured *during* the period of exposure to the drug, thus simulating conditions analogous to those existing *in vivo* during a period of drug administration.

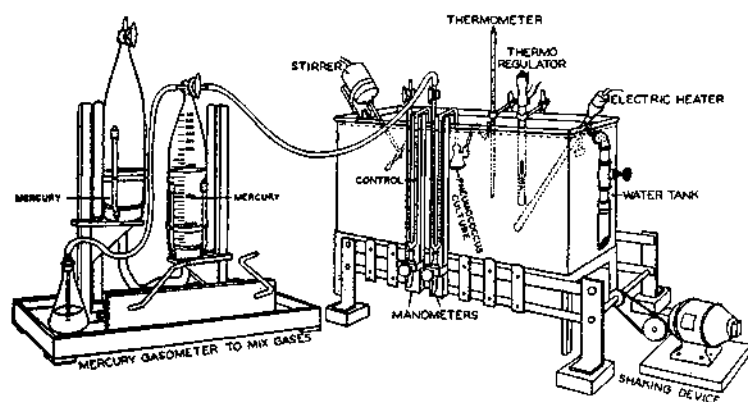


FIG. 2.—The Warburg apparatus.

Figure 2 gives a picture of the apparatus. Cone-shaped or rectangular glass vessels of about 18 to 20 cc. capacity, containing 2 to 6 cc. of the bacterial suspension and the various sulfonamides, previously evaporated in the vessel, are filled with air or nitrogen or with CO_2 /air or CO_2 /nitrogen mixtures and shaken in the thermostat ($38^\circ C.$) at a rate of 100 to 200 oscillations per minute. After the vessels have been closed gas tight, every change in the gas pressure within the bacteria suspension can be read on the manometer.

The only difficulty in such a manometric determination of the sulfonamide effect is that it presupposes a knowledge of the normal, *i. e.*, the drug-free bacterial metabolism, under various physiological and pathological conditions. Mere variations of O_2 and CO_2 concentration, for instance, can influence the growth rate of pneumococcus very markedly.

As will be seen from Figures 3 and 4, pneumococcus under certain experimental conditions (in the absence of a substrate of anaërobic

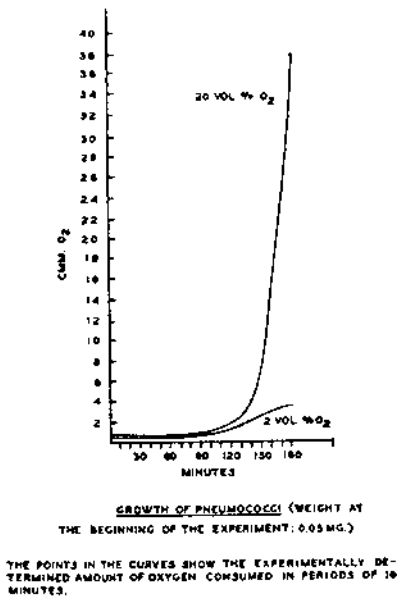


FIG. 3.

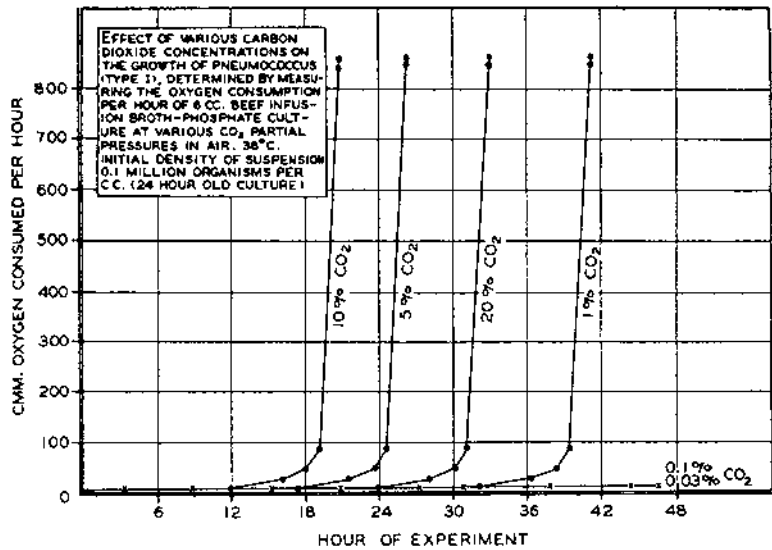


FIG. 4

EFFECT OF SULFONAMIDE DRUGS ON PNEUMOCOCCUS 5

fermentation) grows very well in air and hardly at all at 2 volume per cent O_2 . An increased CO_2 concentration, in spite of a more unfavorable pH, will stimulate growth, whereas in the absence of CO_2 growth may be entirely prevented. It is therefore imperative to work under constant gas conditions whenever pneumococcus growth, with and without the addition of drugs, is to be compared.

It is a well-known fact that the sulfonamide effect is the greater, the smaller the inoculum, the older the original culture and the poorer the medium.³ But in order to simulate the conditions of massive infections in the body and to produce optimal growth in the drug-free culture within a few hours, in most of our experiments very young cultures (two hours old) and relatively large inocula were used, the initial density of the cultures being 0.1 to 100 million organisms per cubic centimeter. The culture medium was beef infusion—1 per cent (Difco-bacto) peptone broth with and without glucose. The medium was used either without any buffer added or with 0.01 to 0.03 m. phosphate or 0.01 to 0.025 m. bicarbonate. When the term "blood broth" is used in the Figures, it means that 1 cc. citrated sheep blood was added to 9 cc. of broth.

To conform to the mode of expression customary in the clinic, the quantity of the various drugs used is not given in molar but in percentage concentration. In molar concentration a 10 mg. per cent concentration of sulfanilamide would be $0.58 \cdot 10^{-3}$ M, of sulfapyridine $0.40 \cdot 10^{-3}$ M, of sulfathiazol $0.39 \cdot 10^{-3}$ M, etc. The drugs tested were: sulfanilamide (Merck), sulfapyridine sodium (Merck), sulfathiazol (Winthrop), sulfathiazol sodium (Squibb), sodium disulon (Alba Pharm. Co.), sulfaguanidine (Lederle), sulfadiazine (Lederle).

Figure 5 shows the influence of 8 mg. per cent sulfathiazol on the growth of pneumococcus Type I, determined by measuring the O_2 consumption and CO_2 formation in air. The difference between the drug-free culture and the sulfathiazol culture is evident as early as thirty-five minutes after the beginning of the experiment, the inhibition of growth being 67 per cent; after one hundred and fifteen minutes, the sulfathiazol culture shows an oxygen consumption of 280 c.mm. as against 500 c.mm. of the control. The same ratio was found whether the O_2 consumption or the CO_2 formation was determined.

Figure 6 shows the effect of 8 mg. per cent sulfathiazol on the growth of a pneumococcus culture, Type I, determined aërobically

6 HANES, KEMPNER:

by measuring the O₂ consumption in 5 per cent CO₂/air, and anaëro-
bically by measuring the CO₂ formation in 5 per cent CO₂/nitrogen.
The sulfonamide effect is apparent in nitrogen as well as in air.

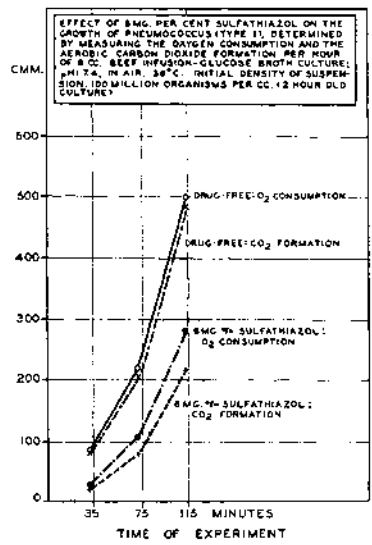


FIG. 5.

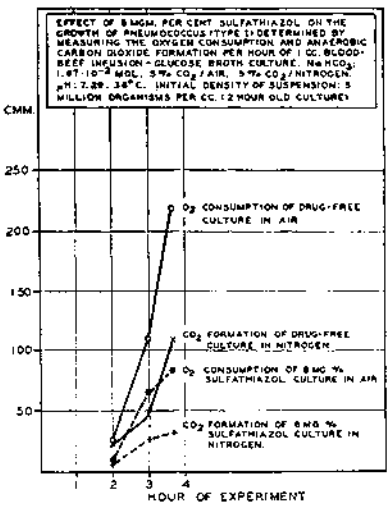


FIG. 6.

EFFECT OF SULFONAMIDE DRUGS ON PNEUMOCOCCUS

7

Figure 7 shows the effect of 1 mg. of sulfathiazol on the growth rate of pneumococcus Type I in beef infusion-glucose broth. The initial bacterial concentration was considerably smaller than in the experiment shown in Figure 6, so that even a concentration of 1 mg. per cent sulfathiazol caused a retardation of growth of as much as 40 against 860. Due to the accumulation of the harmful metabolic end-products, the O_2 consumption decreases rapidly after the culture has reached its maximal growth, and lysis begins.

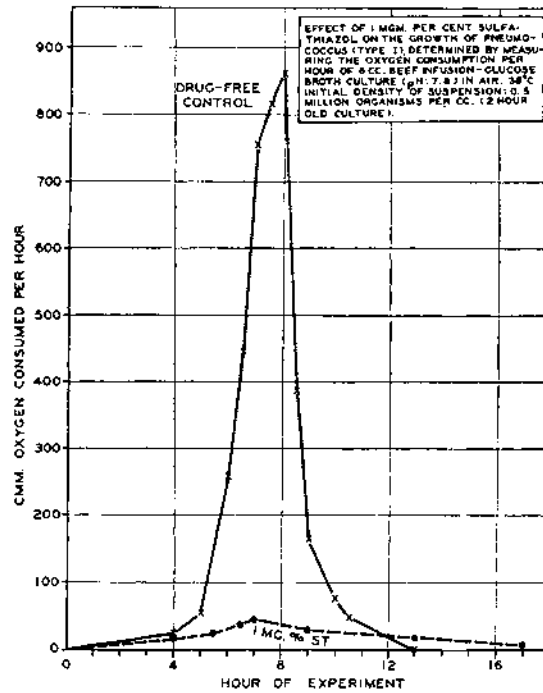


FIG. 7.

Figure 8 shows the drug effect in a culture medium which is periodically renewed, so that the growth of the drug-free control is not stopped by the deterioration of the medium. The drug-free control grows without interruption whereas the pneumococci in the drug-containing culture are prevented from reaching the logarithmic phase of multiplication.

Figure 9 shows the effect of sulfathiazol at variations of CO_2 concentration and pH. The pneumococcus grows considerably better

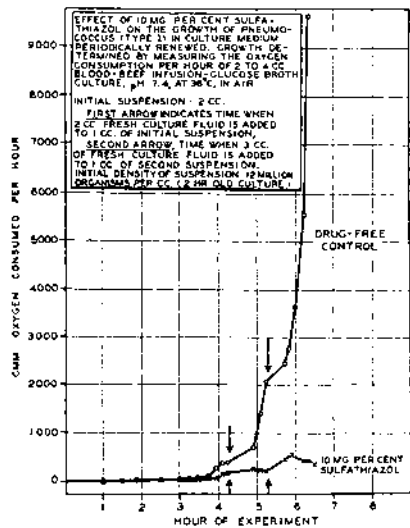


FIG. 8.

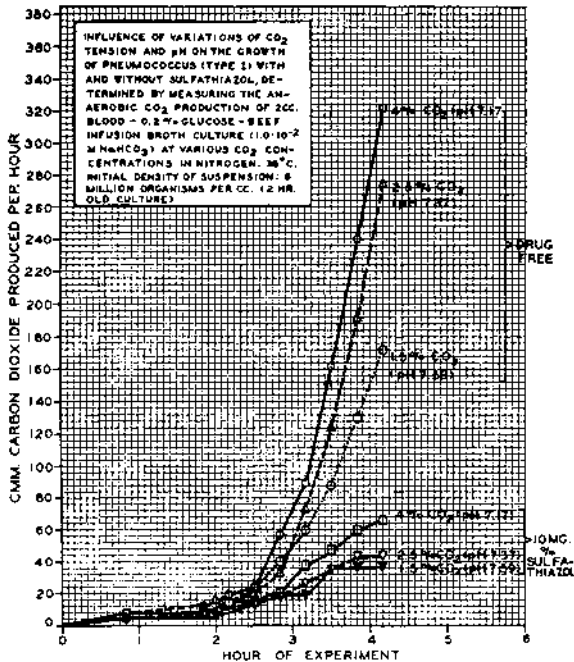


FIG. 9.

EFFECT OF SULFONAMIDE DRUGS ON PNEUMOCOCCUS 9

at higher CO_2 concentrations, even though the pH is more acid. Under the more favorable growth conditions, at 4 per cent CO_2 (pH: 7.17), the inhibitory effect of the sulfathiazol is most pronounced, but at 2.5 per cent CO_2 (pH: 7.37) and 1.5 per cent CO_2 (pH: 7.59), the drug effect is also clearly visible. We may conclude from this experiment that changes in CO_2 concentration and pH, as they occur in patients, will not influence the effect of sulfonamides to any appreciable degree.

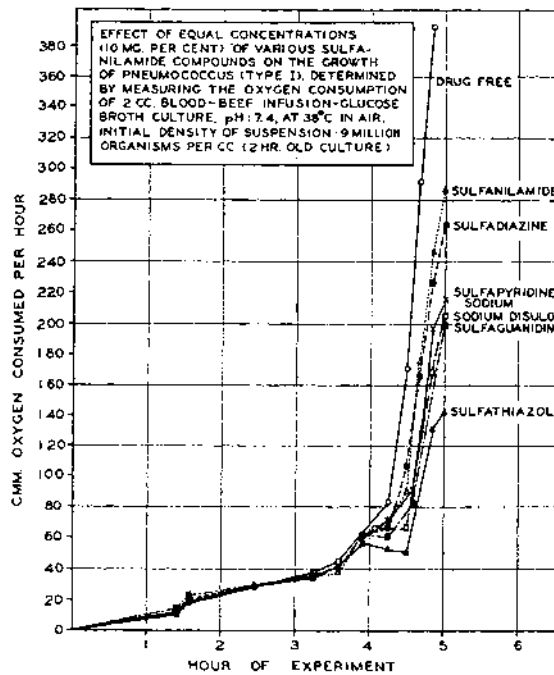


FIG. 10.

Figure 10 shows the effect of an equal concentration, 10 mg. per cent, of various sulfonamides on the growth rate of pneumococcus Type I, determined by measuring the oxygen consumption per hour of 2 cc. of a blood-glucose-beef infusion broth culture (pH: 7.4) in air. The initial density of the suspension was 9 million organisms per cubic centimeter of a culture two hours old. The pneumococcus metabolism was measured every fifteen minutes for five hours. The least effective drug is sulfanilamide, then comes sulfadiazine, then

of about the same strength, sulfapyridine sodium, sodium disulon and sulfaguanidine; the most effective drug is sulfathiazol. In this, and in all other experiments, the effect of sulfathiazol sodium was found to be identical with that of sulfathiazol. The O_2 consumption per hour of the pneumococcus culture was, after five hours in sulfanilamide, 287 c.mm., in sulfathiazol, 142 c.mm., *i. e.*, in sulfanilamide, the number of bacteria grown was 100 per cent higher than in sulfathiazol of equal percentage concentration.

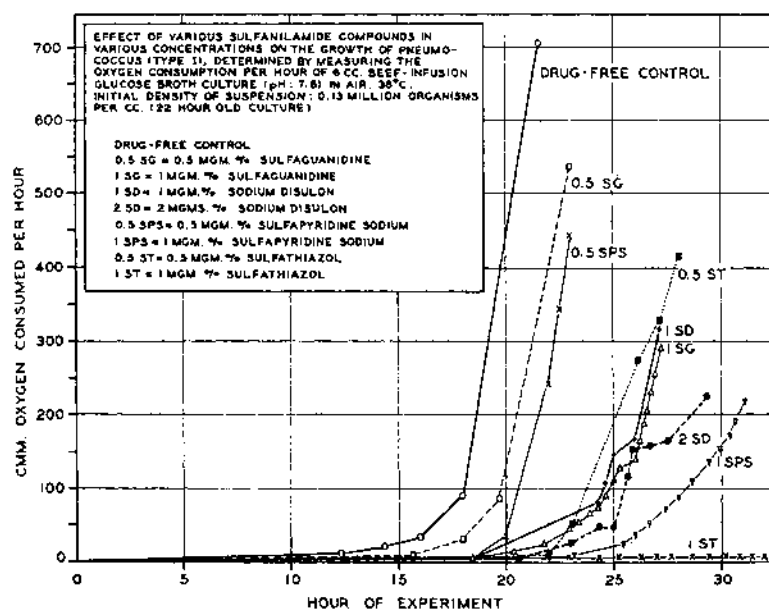


FIG. 11.

Figure 11 shows the effect of various sulfonamides in various concentrations on the growth rate of pneumococcus, Type I. The O_2 consumption per hour was measured in 6 cc. beef infusion glucose broth culture (pH: 7.8), containing 0.13 million organisms per cubic centimeter. The original culture was relatively old (twenty-two hours), so that optimal growth in the drug-free control occurred only after twenty-one hours. The order of potency can be read on the curve from the amount of time needed by the various drug-containing cultures to reach the logarithmic phase of multiplication. The order is as follows: 0.5 mg. per cent sulfaguanidine, 0.5 mg. per

EFFECT OF SULFONAMIDE DRUGS ON PNEUMOCOCCUS 11

cent sulfapyridine sodium, 0.5 mg. per cent sulfathiazol, 1 mg. per cent sodium disulon, 1 mg. per cent sulfaguanidine, 2 mg. per cent sodium disulon, and finally 1 mg. per cent sulfathiazol, where even after thirty-five hours no growth occurred at all.

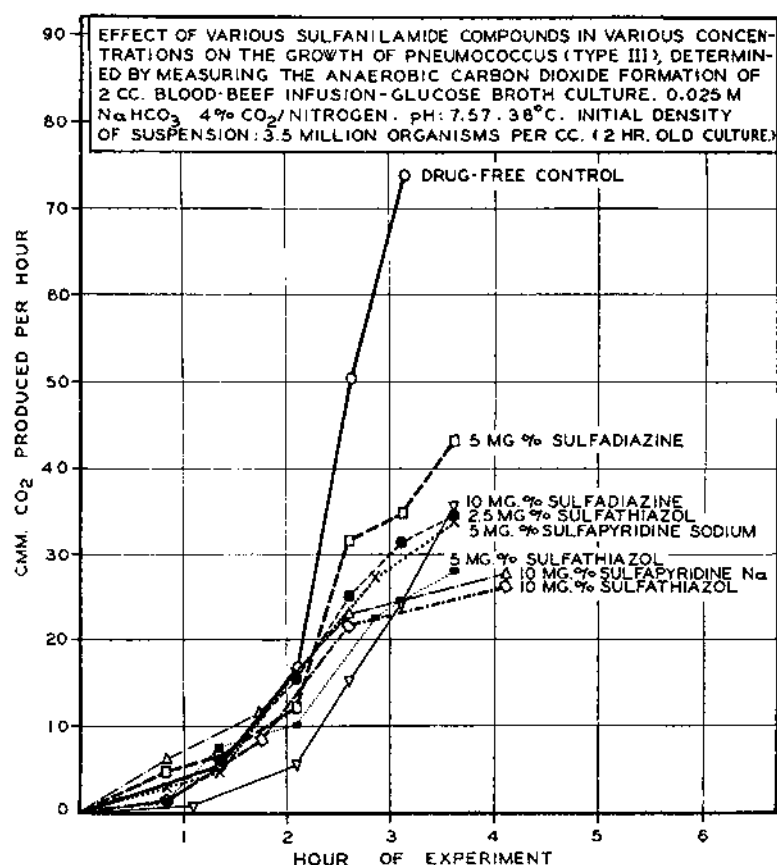


FIG. 12.

Figure 12 shows the effect of various concentrations of sulfadiazine, sulfapyridine sodium and sulfathiazol on the growth rate of pneumococcus Type III, measured under anaërobic conditions. The initial density of the suspension was more than 25 times as great as in the experiment shown on Figure 11 (3.5 million organisms per

cubic centimeter) and the original culture was only two hours old. As early as three to four hours after the beginning of the experiment, the order of potency of the drugs can be read from the curve. With the same concentration of drugs used, the greatest inhibition was caused by sulfathiazol, second by sulfapyridine sodium and least by sulfadiazine, while the same inhibitory effect was caused by the three drugs in a concentration of 10 mg. per cent sulfadiazine, 5 mg. per cent sulfapyridine sodium and 2.5 mg. per cent sulfathiazol. It is thus seen that one must bring about a sulfapyridine sodium concentration in the blood twice as high, and a sulfadiazine concentration four times as high as that of sulfathiazol, in order to produce in the patient a sulfonamide blood level of equal effectiveness against pneumococcus infection.

SUMMARY. The measurement of the chemical reactions of pneumococcus by the manometric technic of Warburg, is discussed as a sensitive, quantitative method for determining the bacteriostatic and bacteriocidal effects of the sulfonamides under physiological conditions, as compared with the conventional bacteriological methods.

After examining the effect of growth-influencing factors, such as changes in O_2 and CO_2 concentrations on drug-free cultures, the effect of various sulfonamides on pneumococcus was studied, under constant experimental conditions, by recording the pneumococcus growth at fifteen to thirty minute intervals for five to thirty-five hours. Very young cultures, large inocula and optimal culture media were used.

The growth rate of pneumococcus with and without sulfonamides was determined by measuring the culture's O_2 consumption and CO_2 formation in air as well as CO_2 formation in nitrogen. The inhibition caused by the various sulfonamides was found to be the same under all three conditions.

The drug effect was measured in an optimal culture medium which was in some experiments periodically renewed, in others not renewed. In the unrenewed medium, for instance, a retardation of growth by sulfathiazol of 40 against 860 was found, after eight hours, followed by a rapid decrease of O_2 consumption and growth, due to the exhaustion of the medium and the lysis of the pneumococcus. In the renewed medium, the drug-free control grew without interruption whereas the drug-containing culture was prevented from reaching the logarithmic phase of multiplication.

EFFECT OF SULFONAMIDE DRUGS ON PNEUMOCOCCUS 13

The sulfathiazol effect was measured at variations of CO_2 concentration and pH, and could be demonstrated throughout the ranges that occur in the patient.

On measuring the effect of various sulfonamides of the same percentage concentration on the growth rate of pneumococcus, sulfanilamide proved to be the least effective drug, then sulfadiazine, then of about the same strength, sulfapyridine sodium, sodium disulon and sulfaguanidine. The most effective drug was sulfathiazol which was identical in potency with sulfathiazol sodium. It was found that in order to produce an inhibitory effect of the same magnitude with the various drugs, twice the concentration of sulfapyridine sodium was necessary as that of sulfathiazol, and twice the concentration of sulfadiazine as that of sulfapyridine sodium.

REFERENCES

1. WARBURG, O.: *Stoffwechsel der Tumoren*, Berlin, Springer, 1926.
2. SCHLAYER, C.: The Influence of Oxygen Tension on the Respiration of Pneumococci (Type I), *Jour. Bacteriol.* **31**, 181, 1936.
3. LONG, P. H. and BLISS, E. A.: *The Clinical and Experimental Use of Sulfanilamide, Sulfapyridine and Allied Compounds*, New York, The Macmillan Company, 1939.

**SCIENTIFIC PUBLICATIONS
BY
WALTER KEMPNER, MD**

Volume I

Studies in Cellular Physiology